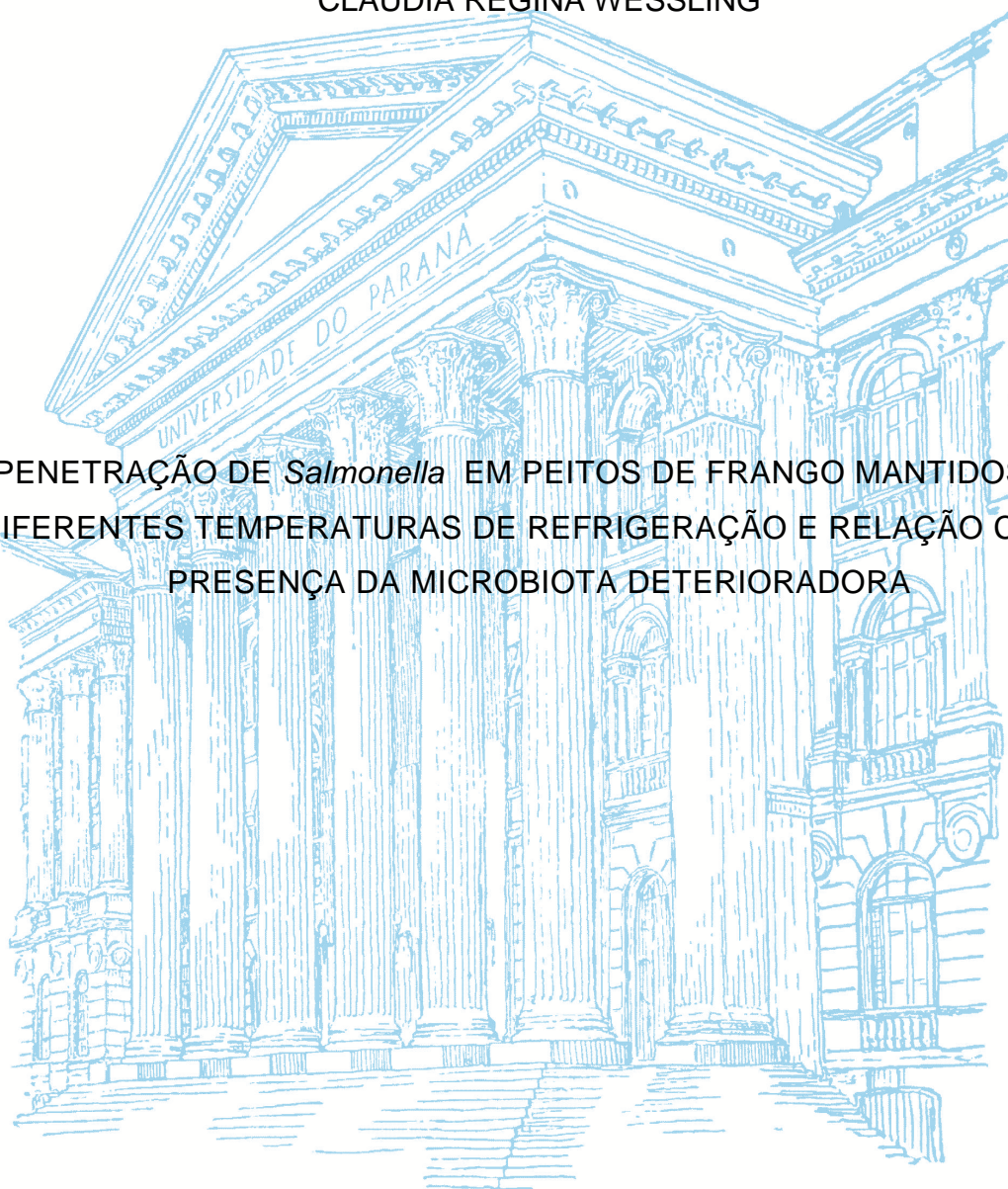


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA REGINA WESSLING

PENETRAÇÃO DE *Salmonella* EM PEITOS DE FRANGO MANTIDOS EM  
DIFERENTES TEMPERATURAS DE REFRIGERAÇÃO E RELAÇÃO COM A  
PRESENÇA DA MICROBIOTA DETERIORADORA



PALOTINA

2014

CLAUDIA REGINA WESSLING

PENETRAÇÃO DE *Salmonella* em PEITOS DE FRANGO MANTIDOS EM  
DIFERENTES TEMPERATURAS DE REFRIGERAÇÃO E RELAÇÃO COM A  
PRESENÇA DE MICROBIOTA DETERIORADORA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, área de concentração em Microbiologia Aplicada a  
Produção Animal, linha de pesquisa Microbiologia de alimentos,  
segurança e inocuidade de alimentos, Setor Palotina, Universidade  
Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2014

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

W515 Wessling, Claudia Regina

Penetração de *Salmonella* em peitos de frango mantidos em diferentes temperaturas de refrigeração e relação com a presença de microbiota deterioradora / Claudia Regina Wessling; Orientador Luciano dos Santos Bersot -- São Carlos, 2014.  
88p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) -- Área de concentração em Microbiologia Aplicada a Produção, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, 2014.

1. *Salmonella* - Contaminação. 2. Microbiologia dos Alimentos. 3. Carne de Frango - Conservação. 4. Frango - Abate. I. Bersot, Luciano dos Santos, orient. II. ~~Título~~

Ficha catalográfica elaborada por Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



## TERMO DE APROVAÇÃO

CLAUDIA REGINA WESSLING

PENETRAÇÃO DE Salmonella EM PEITOS DE FRANGO MANTIDOS EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS DE REFRIGERAÇÃO E RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE MICROBIOTA  
DETERIORADORA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Presidente/Orientador: Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro: Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Elisabete Takiuchi

Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 20 de março de 2014.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Claudia Regina Wessling, filha de Edegar Wessling e Vanete Inês Ulsenheimer Wessling, nascida em 11 de junho de 1990, no município de Toledo, estado do Paraná. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Paranaense (UNIPAR), campos de Toledo, em fevereiro de 2008. Em janeiro de 2012 obteve o título de Bióloga. Iniciou o curso de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Federal do Paraná em abril de 2012.

“A maior recompensa pelo trabalho  
do homem não é o que ele ganha com isso,  
mas o que ele se torna com isso”

JHON RUSKIN

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Edemar e Vanete, minha irmã Milena e meu noivo José. Não conquistaria nada se não estivessem ao meu lado. Amo todos vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar força interior para superar as dificuldades e por me abençoar em toda minha trajetória!

Aos meus pais Edeimar e Vanete pelo carinho, apoio, incentivo em todos os momentos, por acreditar no meu potencial, por serem exemplos de dedicação e perseverança..., me faltam palavras para lhes agradecer por tudo que já fizeram por mim... enfim....AMO VOCÊS!!!!

A minha Irmã Milena, por ser esta pessoinha tão especial e maravilhosa, você é do jeitinho que eu pedi a Deus... TE AMO Mi...

Ao meu noivo, José (amor da minha vida) pelo amor a mim dedicado durante todos estes anos, apoio incondicional, pelo carinho, respeito, por me aturar nos momentos de estresse, enfim por tornar minha vida cada dia mais feliz....José EU TE AMO!

Ao meu orientador Professor Luciano, pela confiança que depositou em mim mesmo sem me conhecer direito, pela paciência, palavras de incentivo, disponibilidade para minhas dúvidas. Professor o senhor é um exemplo de dedicação a pesquisa e profissionalismo e fez uma diferença imensurável na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.Tenho muito orgulho de dizer que fui sua orientada!

A Vanessa, sempre tão atenciosa e que foi essencial na elaboração deste trabalho!

Aos colegas de mestrado, em especial a Cibeli e o Nelson os quais eu recorria em momentos de dúvidas e preocupações e que compartilharam comigo estes dois anos muito importantes da minha formação, vocês tem um lugarzinho no meu coração!

As meninas que me ajudaram nas análises microbiológicas, Krishna, Fabiane, Cíntia e Luana, além das residentes Camila e Ana Paula.

Enfim, a todo o pessoal do LACOMA, que neste período foram uma segunda família,vou sentir muita falta de todos.

Durante estes dois anos só tenho a agradecer as pessoas que passaram pelo meu caminho e aquelas que vem me acompanhando a vida inteira, com certeza todos vocês foram essenciais para que este trabalho se realizasse. Encerro os



agradecimentos, em pratos por sinal, deixando o meu MUITO OBRIGADA A TODOS!

## **Penetração de *Salmonella* em Peitos de Frango Mantidos em Diferentes Temperaturas de Refrigeração e Relação com a Presença de Microbiota Deterioradora**

*Salmonella* é um dos principais patógenos envolvidos com a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos, sendo que na maioria das vezes o patógeno é veiculado por produtos a base de frango. Inicialmente, durante as etapas tecnológicas de abate a contaminação de carcaças de frango por *Salmonella* se dá de forma superficial, entretanto com as alterações teciduais provocadas pelo processo de autólise ou pelo desenvolvimento de microbiota deterioradora, pode ocorrer penetração de *Salmonella* e outros micro-organismos, para regiões mais profundas dos tecidos, dificultando sua eliminação ou inativação aumentando o risco de ETA. Trabalhos têm evidenciado presença de *Salmonella* no interior de tecidos, especialmente carne de frango. Nestes estudos a penetração do patógeno para o interior do tecido está relacionada alguns fatores principais, como por exemplo: 1- da quantidade e grupos de microbiota autóctone deterioradora e que podem facilitar a penetração do patógeno pelo efeito do seu metabolismo sobre a estrutura tecidual; 2-das condições de temperatura de armazenamento dos cortes de frango que podem facilitar a multiplicação da microbiota deterioradora ou a ação direta sobre a penetração ativa do patógeno; 3-das condições estruturais do tecido, que podem estar sujeitas alterações decorrentes de reações bioquímicas *post mortem* ou decorrentes de processos tecnológicos, podendo estas alterações estruturais servir de rota para penetração de patógenos. Pelo exposto, a presente proposta de pesquisa destina-se averiguar a influência dos fatores supracitados no comportamento de *Salmonella* em peito de frango.

**Palavras-Chave:** Carne de frango, Microbiota deterioradora, Penetração, *Salmonella*

## **Penetration of *Salmonella* in Chicken Breasts Maintained at Different Temperatures of Colling and Relation to the Presence of Spoilage Micro-organisms**

*Salmonella* is one of the main pathogens involved in the occurrence of foodborne illness, and most of the time the pathogen is transmitted by products made from chicken. Initially, during the technological contamination during slaughter of poultry carcasses by *Salmonella* occurs in a superficial way, however with the tissue changes caused by the autolysis process or developing spoilage micro-organisms, penetration of *Salmonella* and other micro-organisms to deeper regions of tissue can occur, hindering their removal or inactivation increasing the risk of ETA. Studies have reported the presence of *Salmonella* inside tissues, especially chicken. In these studies pathogen penetration into the tissue is related to some key factors, such as: 1 - groups and the amount of indigenous spoilage micro-organisms and may facilitate penetration of the pathogen by the effect of metabolism on the tissue structure; 2-temperature conditions of storage of chicken parts that can facilitate the multiplication of spoilage micro-organisms or direct action on the active penetration of the pathogen; 3 - structural conditions of the tissue, which may be subject to changes due to post-mortem biochemical reactions or resulting from technological processes, these structural changes may serve as a route for penetration of pathogens. For these reasons, this research proposal aims to determine the influence of the above factors on the behavior of *Salmonella* in chicken breast.

**Key-words:** Chicken meat, Spoilage micro-organisms, Penetration, *Salmonella*

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
APT	Água Peptonoda tamponada
BAL	Bactérias láticas
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
BS	Bismuto de sulfito
BOD	BiochemicalOxygenDemand
CFC	Ágar Cetrimide
cm	centímetro
ECDC	EuropeanCenter for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramas
hab	habitante
h	hora
IAL	Índice de Coleções do Instituto Adolfo Lutz
Kg	KiloGramas
LACOMA	Laboratótio de Controle Microbiológico e Inspeção de Água e
Alimentos	
LIA	Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento
min	Minutos
MKTTn	Caldo Tetrionato Müller KauffmannNovabiocina
mL	Mililitros
MRS	Ágar Man Rogosa Sharpe
NA	Ágar Nutriente
NAL	Ácido Nalidíxico
PCA	Ágar Padrão Para Contagem
Rpm	Rotação por minuto
RVS	Caldo Rappaport Vassilidis Soja

SP	São Paulo
SS	Solução Salina
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Esquema Kaufmann-White de identificação de sorovares de <i>Salmonella</i> , de acordo com as espécies e subespécies (GUIBOURDENCHE et al., 2010) .....	24
Tabela 2.	Tratamentos, temperaturas e tempos de armazenamento realizados nas subamostras de peito de frango sem pele e sem osso.....	40
Tabela 3.	Médias das contagens <i>Pseudomonas</i> spp., BAL, Psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em log/UFC/g nas amostras de peito de frango com e sem presença de <i>Salmonella</i> spp. obtidas do varejo da cidade de Palotina – PR.....	49
Tabela 4.	Médias das contagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) e nos Tratamento I e II.....	52
Tabela 5.	Médias das contagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) no Tratamento I.....	53
Tabela 6.	Médias das contagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) no Tratamento II.....	54
Tabela 7.	Médias das contagens de <i>Pseudomonas</i> spp. em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) no tratamento II.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama das análises microbiológicas da investigação da microbiota deterioradora e <i>Salmonella</i> spp. de peitos de frango postos a venda no comércio varejista. ....	39
Figura 2.	Fragmentação dos peitos de frango em subamostras. ....	41
Figura 3.	Procedimento de padronização dos inóculos de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Pseudomonas fluorescens</i> . ....	42
Figura 4.	Inoculação de <i>S. Enteritidis</i> (tratamento I) e <i>S. Enteritidis</i> e <i>P. fluorescens</i> (tratamento II) nas subamostras de peito de frango.....	44
Figura 5.	Esquema contaminação das subamostras de peito de frango e sentido da penetração de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	45
Figura 6.	Divisão das subamostras de peito de frango após as simulações de refrigeração em segmentos de 1 cm. ....	46
Figura 7.	DiaGrama da investigação da penetração de <i>Salmonella</i> Enteritidis em peitos de frango expostos a diferentes condições de temperatura.....	48
Figura 8.	Penetração de <i>S. Enteritidis</i> a 2°C (A), 7°C (B) e 12°C (C) - Tratamento I em cada segmento da sub-amostra.....	53
Figura 9.	Penetração de <i>S. Enteritidis</i> a 2°C (A), 7°C (B) e 12°C (C) – Tratamento II em cada segmento das subamostras. ....	55

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
1.2 Objetivo Geral.....	19
1.3 Objetivos específicos.....	19
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
3.1 Microbiota da carne de aves.....	20
3.2 Caracterização de <i>Salmonella</i> spp. ....	23
3.3 <i>Salmonella</i> spp. em carne de aves.....	24
3.4 Importância de <i>Salmonella</i> spp. em saúde pública.....	27
3.5 Desenvolvimento de <i>Salmonella</i> spp. em carne de aves .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Estudo da ocorrência de <i>Salmonella</i> sp. e microbiota deterioradora em peitos de frango sem pele e sem osso expostos a venda no comércio varejista.....	36
4.1.1 Plano de amostragem e delineamento Experimental.....	36
4.1.2 Obtenção das amostras .....	36
4.1.3 Quantificação de deteriorantes (UFC/g).....	37
4.1.3.1 Quantificação de psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos ....	37
4.1.3.2 Quantificação de bactérias lácticas (UFC/ml).....	37
4.1.3.3 Quantificação de <i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/g).....	38
4.1.3.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	38
4.2 Estudo da penetração de <i>Salmonella</i> em peitos de frango .....	39
4.2.1 Plano de amostragem e delineamento Experimental.....	39
4.2.2 Descrição das amostras e subamostras de peito de frango .....	40
4.2.3 Preparo do cultivo de <i>Salmonella</i> Enteritidis e padronização do inóculo .....	41
4.2.4 Preparação do inóculo de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	42
4.2.5 Inoculação de <i>Salmonella</i> Enteritidis nas subamostras de frango (tratamento I) .....	43
4.2.6 Inoculação de <i>S. Enteritidis</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> nas subamostras de frango (tratamento II).....	43



4.2.7 Confirmação dos inóculos de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	44
4.2.8 Avaliação da penetração de <i>Salmonella</i> Enteritidis nas subamostras de peito de frango armazenadas em diferentes condições de temperatura .....	44
4.2.9 Quantificação de <i>Pseudomonas fluorescens</i> inoculada e da microbiota deterioradora autóctone .....	47
4.3 Análises estatísticas .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>70</b>
Apêndice A. Resultados das contagens microbiológicas ( <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Pseudomonas</i> spp., BAL, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos) na avaliação da penetração de S. Enteritidis em Peito de Frango sob diferentes condições de temperatura (2, 7 e 12°C) tempos de estocagem (24, 48 e 72h) e segmentos (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	71
Apêndice B. Médias das contagens de Bactérias lácticas em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	85
Apêndice C. Médias das contagens de Psicrotróficos em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	85
Apêndice D. Médias das contagens de Psicrotróficos proteolíticos em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C) tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	86

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro maior exportador mundial de carne de frango e o terceiro em produção. No segundo semestre de 2013 foram abatidas 1,442 bilhões de cabeças de frango, estabelecendo uma marca histórica no abate de frangos. No ranking da produção nacional o Paraná é o maior produtor, com aumento de 10,3% no volume de abate em comparação com o ano anterior, com destaque especial para a região oeste do Estado. A expansão da indústria avícola aumentou a disponibilidade do produto oferecido a um custo reduzido elevando o consumo de carne de frango pela população.

A alta tecnologia do abate e processamento de aves e derivados vem possibilitando atender a demanda da produção de proteína de origem animal e inúmeras ferramentas foram desenvolvidas para garantir a qualidade intrínseca dos produtos bem como seu controle higiênico-sanitário. Contudo, o aumento da produção favoreceu a disseminação de patógenos nos plantéis, principalmente inúmeros sorovares de *Salmonella* sp. levando a um aumento das taxas de infecção das aves e, por conseguinte, maior frequência de contaminação das carcaças fazendo com que este patógeno ainda continue a ser um grande problema para a indústria avícola.

Desse modo, a carne de frango é um alimento que frequentemente encontra-se envolvido como veículo para ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA). Estes micro-organismos podem ser oriundos de diversas fontes, como contaminação cruzada no momento do abate e processamento do produto, falha na higienização do ambiente e equipamentos ou de higiene dos manipuladores que entram em contato com o alimento. A quantidade, o tipo de micro-organismos e as condições em que a carne é armazenada podem acelerar seu processo de deterioração ou torná-la um risco a saúde do consumidor como veículo de patógenos causadores de ETA.

Um dos principais micro-organismos causadores de ETA em todo o mundo pertence ao gênero *Salmonella*. Este patógeno entra na cadeia alimentar humana através do consumo de água ou alimentos contaminados, especialmente carne de

frango ou produtos derivados. Dificilmente os frangos de corte conseguem chegar ao abate totalmente livres de contaminação por *Salmonella*. Parte do lote pode conter o patógeno em seu trato digestório e durante as operações de abate, especialmente durante a evisceração, pode haver rompimento de vísceras e extravasamento do material fecal contaminando a carcaça e as carcaças adjacentes, o que exige controle sobre o processo a fim de minimizar uma disseminação ainda maior.

Inicialmente, durante as etapas tecnológicas de abate a contaminação de carcaças de frango por *Salmonella* se dá de forma superficial, transferindo o patógeno originalmente dos intestinos para a pele e seus folículos da pena; entretanto com as alterações teciduais provocadas pelo processo de autólise ou pelo desenvolvimento de microbiota deterioradora, pode ocorrer penetração de *Salmonella* e outros micro-organismos, para regiões mais profundas dos tecidos, dificultando sua eliminação ou inativação, e por conseguinte, aumentando o risco de ETA.

Trabalhos têm evidenciado a presença de *Salmonella* no interior de tecidos, especialmente na carne de frango. Nestes estudos a penetração do patógeno para o interior do tecido está relacionada a alguns fatores principais, como por exemplo: 1- das condições estruturais do tecido, que podem estar sujeitas a alterações decorrentes de reações bioquímicas *post mortem* ou decorrentes de processos tecnológicos. Estas alterações estruturais servir de rota para penetração de patógenos. 2- da quantidade e grupos de microbiota autóctone deterioradora que podem facilitar a penetração do patógeno pelo efeito do seu metabolismo sobre a estrutura tecidual; 3- das condições de temperatura de armazenamento dos cortes de frango que podem facilitar o desenvolvimento da microbiota deterioradora ou a ação direta sobre a penetração ativa do patógeno;

Devido à elevada ocorrência de *Salmonella* em carne de aves, entender o seu comportamento em cortes crus torna-se muito importante para garantia da inocuidade dos alimentos e dos consumidores e, neste contexto, conhecer a penetração de *Salmonella* em músculo de peito de frango e compreender alguns dos fatores que interferem neste processo tem fundamental importância. Tendo conhecimento do mecanismo de penetração e dos fatores que influenciaram neste processo, torna-se possível desenvolver métodos de controle ou eliminação deste patógeno.

## OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVOGERAL

Investigar a penetração de *Salmonella* em peito de frango e a influência que as temperaturas de armazenamento e *Pseudomonas spp.* possa exercer sobre este processo.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de *Salmonella sp.* em peitos de frango sem pele e sem osso expostos à venda no comércio varejista de Palotina, PR;
- Quantificar a microbiota indicadora deteriorante psicrotrófica, psicrotrófica proteolítica, bactérias lácticas e *Pseudomonas sp.* em peitos de frango sem pele expostos à venda no comércio varejista de Palotina.
- Investigar o tempo de penetração de *Salmonella* Enteritidis, a partir da superfície em peitos de frango;
- Investigar a influência da temperatura de armazenamento dos peitos de frango no tempo de penetração de *Salmonella* Enteritidis;
- Investigar a influência da presença de *Pseudomonas fluorescens* no tempo de penetração de *Salmonella* Enteritidis em peitos de frango expostos a diferentes condições de temperatura de refrigeração.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROBIOTA DA CARNE DE AVES

A carne de frango é um alimento de origem animal, rico em proteínas de alto valor biológico e financeiramente acessível para diferentes classes econômicas (MANTILHA et al., 2009) e devido as suas características nutricionais, e as características de criação e do processo tecnológico de abate apresenta-se como um excelente meio para o desenvolvimento de diversos grupos de micro-organismos.

A microbiota inicial e sua possibilidade de desenvolvimento em alimentos cárneos “in natura”, como a carne de frango, dependem de todo um conjunto de fatores que intervêm nas distintas etapas da produção (MANTILLA et al., 2009), podendo ocorrer contaminação por micro-organismos de diferentes origens, como a partir dos próprios animais portadores e dos ambientes de abate e processamento (JAY et al., 2005).

As aves chegam ao abatedouro com uma microbiota aderida às penas e tegumentos cutâneos, no trato digestório e em menor grau no trato respiratório (REITER et al., 2007). Devido ao sistema de abate de aves, a planta de processamento comercial é considerada um dos principais locais para a contaminação das carcaças (LILLIARD, 1990), onde a disseminação de micro-organismos pode ocorrer em várias etapas, como a escaldagem, depenagem, e também por contaminação cruzada de equipamentos e utensílios, evisceração e no acondicionamento da carcaça e cortes em temperaturas inadequadas (BONI et al., 2011).

Lopes et al., 2007 pesquisaram *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores (coliformes totais e termotolerantes, aeróbios mesófilos e psicrotróficos) em carcaças de frango e água dos tanques de pré-resfriamento em um frigorífico no norte do Paraná e verificaram que não houve diferença significativa nas médias das contagens de micro-organismos indicadores e na presença de *Salmonella* spp. nas carcaças de frango antes e após a passagem pelos tanques de pré-resfriamento e

resfriamento. Segundo os autores isso pode ser explicado pela contaminação elevada das carcaças antes do pré-resfriamento, higienização inadequada dos equipamentos, fluxo e temperatura da água dos tanques inadequada.

Fuzihara et al., (2000) também avaliaram a frequência de *Salmonella* em um pequeno abatedouro do Estado de São Paulo, Brasil, e constataram que 42% das carcaças, 71,4% da água de imersão das carcaças, 23% das amostras de utensílios e 71,4% em freezer e refrigeração das amostras apresentavam o patógeno, o que segundo os autores reforça a necessidade de medidas de controle mais eficazes.

Desta forma, admite-se que a presença de micro-organismos nos alimentos durante a produção, armazenamento, transporte e embalagem é inevitável, porém quando presentes em índices elevados indicam condições higiênico sanitárias inadequadas durante a produção do alimento.

De maneira geral, a carne de frango pode se tornar contaminada por dois grandes grupos de micro-organismos, os deterioradores e os patogênicos. Estes últimos são representados principalmente pelo gênero *Salmonella*, muito importante do ponto de vista de saúde pública conforme será discutido no item 2.2. Já em relação aos deterioradores inúmeros grupos de micro-organismos são importantes, principalmente os psicrotróficos proteolíticos, o gênero *Pseudomonas* spp., bactérias lácticas, entre outros.

Os micro-organismos psicrotróficos são definidos como bactérias que apresentam capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (COUSIN, 1982), sendo provenientes de diversos ambientes como solo e água (SILVA, 2005). Há uma grande variedade de micro-organismos psicrotróficos encontrados na carne de frango logo após o abate tais como *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., enterobactérias, *Corynebacterium*, *Micrococos* spp., *Pseudomonas* spp., entre outros (MANTILLA et al., 2009). Muitos destes apresentam atividade proteolítica, ou seja, produzem enzimas proteolíticas ou proteases que incluem as proteinases, que promovem a hidrólise da molécula de proteína em políptídeos e as peptídeos que hidrolisam fragmentos de aminoácidos (FRAZIER e WESTHOFF, 1988), causando alterações sensoriais e físico-químicas na carne (SILVA et al., 2010).

Carvalho et al.(2005) verificaram que a contagem de psicrotróficos variou entre  $10^4$  a  $10^5$  UFC/g em cortes de frango como coxa, sobrecoxa, fígado, moela, peito empanado, linguiça e hambúrguer. Hoffman et al. (1995) analisando a

microbiota psicotrófica em carcaças de frango inteiras encontraram valores entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g. Já Vieira e Teixeira (1997) verificaram uma variação de psicotróficos entre  $2,0 \times 10^1$  e  $3,4 \times 10^5$  UFC/g em carcaças de frango inteiras.

Embora a contagem de micro-organismos aeróbios psicotróficos indique o grau de deterioração de alimentos refrigerados, a legislação brasileira não estabelece padrão para estes micro-organismos. Entretanto, a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1978) estabelece de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g como padrão qualitativo para este grupo. Para Gill (1998) independente dos parâmetros oficiais, quando a contaminação varia entre 6 e 7 log de UFC/cm<sup>2</sup>, os produtos cárneos possuem odor desagradável, indicando processo de deterioração, e a partir de 8.0 log de UFC/cm<sup>2</sup> passam a apresentar formação de limo e alterações de cor e consistência.

O gênero *Pseudomonas* é comumente identificado entre as bactérias psicotróficas, especialmente em carne de frango, sendo responsável pela deterioração dos alimentos armazenados sob refrigeração (ERCOLINI et al., 2009). *Pseudomonas* spp. são bacilos Gram negativos, aeróbios estritos, que constituem um grande gênero de bactérias que existem em alimentos frescos. As espécies mais importantes de deterioração da carne incluem *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chororophis*, *P. clicheorri*, *P. Viridiflava* e *P. syringae* (GARCIA LOPEZ et al., 1998).

Mellor et al. (2011) avaliaram a presença de *Pseudomonas* spp. em carne de frango fresca e armazenada por sete dias e verificaram que a média das contagens da carne fresca foi 2,3 log UFC/g e após sete dias 7,4 log UFC/g.

Bactérias lácticas (BAL) compreendem um grupo muito amplo de micro-organismos, que tem como principal característica a fermentação de carboidratos com produção de ácido láctico. Devido a rápida produção de ácido láctico em grande quantidade, reduzem o pH impedindo o desenvolvimento de micro-organismos competidores (CHAGAS, 1994), sendo por isso, reconhecidos como importantes competidores de outros grupos microbianos (GILL, 1996). São Gram positivas, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativos (SILVA et al., 2010). Algumas espécies são bastante importantes na indústria de alimentos, promovendo a deterioração de carnes refrigeradas como, *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* e *Leuconostoc* spp. (LABADIE, 1999). São poucos os seus ambientes naturais, sendo o principal habitat a corpo de animais de sangue quente,

associando-se a microbiota normal da pele e mucosas como orofaringe, trato gastrointestinal e trato urinário (QUADROS, 2007). Na indústria de alimentos podem estar dispersos na planta de processamento contaminando os alimentos.

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não produtores de esporos e móveis, com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. A temperatura ideal para multiplicação de *Salmonella* é de 35-37°C, considerado como um micro-organismo mesófilo, sendo a temperatura mínima 5°C e a máxima 47°C, no entanto os valores de máximo e mínimo dependem do sorovar, sendo que alguns também podem exibir propriedades psicotróficas, com capacidade de multiplicação em alimentos armazenados entre 2 e 4°C (D'AOUST, 1991). Desenvolvem-se em uma faixa muito ampla de pH que pode variar de 4,5 a 9,5, com ótimo de crescimento em pH entre 6,5 e 7,5. *Salmonella* spp. é considerada uma bactéria ubiquitária, podendo ser isolada em todo o mundo, sendo o trato intestinal de homens e animais o seu principal reservatório (DOYLE et al., 2005).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* é realizada através de uma sucessão de esquemas taxonômicos com base nas características bioquímicas e sorológicos e em princípios de homologia do DNA. Atualmente o esquema Kauffman-White é o mais utilizado, que divide o gênero *Salmonella* em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, a primeira isolada mais comumente em humanos e animais endotérmicos e a segunda geralmente isolada em animais ectotérmicos (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009). *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *salamae* e *indica* que, são divididos em vários sorotipos ou sorovares baseada em sua composição antigênica das bactérias do gênero, com relação aos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Os antígenos "O" são designados através de números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* spp., sendo comum a vários sorovares. Já os antígenos flagelares "H" podem ocorrer em duas fases (1 e 2) e são designados por letras minúsculas do alfabeto. Como seu número é maior do que a quantidade de letras do alfabeto, a letra Z é utilizada como indicadores numéricos



(z1, z2, z3...) (DOYLE et al., 2005). Os diferentes antígenos de *Salmonella* são identificados por meio de testes de imunoaglutinação com emprego de anti-soros, preparados em coelho e cuja apresentação comercial se dá na forma de plasma liofilizado (TRABULSI et al., 2005). Segundo dados do Instituto Pasteur, até o momento foram identificados 2610 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010/ ECDC/EFSA, 2012) (Tabela 1). Dentre as espécies, *S.enterica* é considerada a mais importante, já que mais de 99% dos sorovares isolados em humanos pertencem a ela (TRABULSI et al., 1999).

Tabela 1. Distribuição dos sorovares de *Salmonella* de acordo com o sistema de classificação Kaufmann- Witte

<b>Espécies</b>	<b>Subespécies</b>	<b>Número de sorovares</b>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i>	1547
	<i>salamae</i>	513
	<i>arizonae</i>	100
	<i>diarizonae</i>	341
	<i>houtanae</i>	73
	<i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>		23
Total		2610

FONTE: (GUIBOURDENCHE et al., 2010)

### 2.3 *Salmonella* spp. EM CARNE DE AVES

Com relação aos patógenos da carne de aves, *Salmonella* assume um papel epidemiológico muito importante. A complexa epidemiologia de *Salmonella* na cadeia de produção de aves envolve a transmissão vertical, dos reprodutores para os embriões, desencadeando o nascimento de aves já infectadas. Envolve também a transmissão horizontal, com contaminação através da presença da bactéria no ambiente e ração, além da existência de diferentes animais que atuam como reservatório para a bactéria, como roedores e aves silvestres. Assim os lotes de frangos podem ser tornar contaminados com *Salmonella* com percentuais variáveis de positividade ainda nas granjas.

Adicionalmente, as operações de transporte (pré-abate) e o processamento da carcaça na indústria podem, por meio da contaminação cruzada, aumentar o percentual de positividade (SILVA e DUARTE, 2002), sendo que o processo tecnológico de abate de aves constitui uma fonte potencial de disseminação da contaminação entre as carcaças. Durante o abate uma das etapas mais importantes para a contaminação de carcaças com enteropatógenos, especialmente *Salmonella*, é a evisceração, pois existe o risco de perfuração das vísceras, com extravasamento do material fecal. Estes fatores têm contribuído para que *Salmonella* continue a ser um dos patógenos mais identificados em produtos avícolas expostos ao consumo (SILVA e DUARTE, 2002).

*Salmonella* spp. pode causar três tipos de doenças subclínicas nas aves: Pulorose, Tifo e Paratifo aviário. Estas alterações patológicas são provocadas por sorovares específicos de *Salmonella*, por exemplo, a pulorose por *S. Pullorum*, e o tifo por *S. Gallinarum*. No passado essas duas doenças representavam um grande problema para a indústria avícola, pois ocasionavam perdas econômicas nos plantéis avícolas devido a perda de peso, as condenações ao abate, ao aumento da mortalidade, entre outras. Com o aumento das medidas de controle e biossegurança nos últimos anos, estes sorovares foram praticamente erradicados dos plantéis avícolas industrializados (SILVA e DUARTE, 2002).

O paratifo aviário é causado por sorovares de *Salmonella* que não são adaptados as aves, os quais são muito importantes em saúde pública, visto que não causam sinais em aves adultas (BORGES, 2001).

Estudos que avaliam a prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango são realizados em todo o mundo e, verifica-se que a prevalência é muito variável. Na França, em estudo realizado por Hue et al. (2011), a prevalência de *Salmonella* sp. em carcaças foi de 7,52%. Yang et al. (2011), encontraram 52% de positividade para *Salmonella*, de um total 1.152 carcaças de frango avaliadas em duas cidades da China em 2010. Sakaridis et al., (2011) avaliaram 150 carcaças de frango em abatedouros do norte da Grécia, encontrando 37% carcaças positivas para *Salmonella* sp., sendo que a prevalência entre os abatedouros pesquisados variou entre 12% e 80%. Em um estudo comparativo feito por Álvarez-Fernández et al., (2012) na Espanha, constataram que de 1993 a 2006 a porcentagem de carcaças de frango positivas para *Salmonella* sp.. diminuiu de 73,55% para 12,4% em média no período do estudo. Na Rússia a prevalência média de *Salmonella* sp.. foi de 31,5%,

considerando 698 amostras coletadas no mercado varejista de três diferentes regiões (ALALI et al., 2012).

Donado-Godoy (2012) na Colômbia, demonstrou que em um total de 1.003 carcaças de frango analisadas, a prevalência geral de *Salmonella* sp.. foi de 27%.

No Brasil, também observa-se que há uma grande variação na frequência de isolamento. Santos et al. (2000) observaram um percentual de 32% de contaminação por *Salmonella* sp. em 150 carcaças de frango congeladas oriundas de abatedouros localizados no estado de São Paulo. Das carcaças de frango avaliadas no norte do Estado do Paraná entre os anos de 1999 e 2000, 20% foram positivas para *Salmonella* (GASPARETTO et al, 2001). Rezende et al.(2005) constataram 19,8% de positividade para este patógeno quando avaliaram 96 carcaças de frango, provenientes de abatedouros do estado de Goiás. Já Medeiros et al. (2011) avaliaram a prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango em 15 cidades brasileiras de setembro de 2004 a julho de 2006 e encontraram uma prevalência nacional de 2,7%.

Dentre os diversos sorovares existentes, alguns apresentam uma prevalência superior e não tem uma distribuição geográfica definida, podendo ser isolado em todo o mundo. Como é o caso de *Salmonella* Enteritidis que emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública mundialmente a partir da década de 80 e no Brasil a partir de 1993. Estudos epidemiológicos sugerem a entrada de *S. Enteritidis* no Brasil via importação de material genético avícola contaminado (SILVA e DUARTE, 2002). Atualmente é um dos principais sorovares isolados de carcaças de aves (MEDEIROS et al., 2011; ZDRAGAS et al. 2012). O aumento da prevalência de *S. Enteritidis* em aves pode estar relacionada com as tentativas de erradicação de *S. Gallinarum* dos plantéis, uma vez que esta excluía competitivamente *S. Enteritidis* (SILVA e DUARTE, 2002).

Trabalhos têm evidenciado a prevalência de *S. Enteritidis* em carcaças e cortes de frango (BAÚ et al.,2001; CAPITA et al., 2007; MEDEIROS et al., 2011; ALVAREZ-FERNANDÉZ et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Conforme a Agência de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008) os dez sorovares mais frequentes isolados de carcaças de frango e aves no Brasil em 2008 foram: *S. Enteritidis* (48,8%); *S. Infantis* (7,6%); *S. Typhimurium* (7,2%); *S. Heidelberg* (6,4%).

No entanto, apesar da importância histórica de *Salmonella* em aves e como causador de ETA no Brasil não existe padrão de pesquisa microbiológico para *Salmonella* nos produtos de origem avícola, e o único padrão oficial exigido para carne de aves é a contagem de coliformes a 45°C, que deverão atender a um limite máximo de  $10^4$  UFC/g (BRASIL, 2001). A legislação europeia é mais rigorosa no controle de *Salmonella* e prevê ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra analisada (EC, 2007), e nos Estados Unidos o controle sanitário das carcaças é realizado através da pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. cujos padrões são de 2 a 3 log UFC/g e ausência em 20% das análises para estes micro-organismos, respectivamente (USA, 2003).

Visto a necessidade de oferecer produtos seguros aos consumidores e para atender as exigências dos mercados importadores, que não aceitam produtos que apresentem contaminação por *Salmonella* spp. o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) desenvolveu alguns programas a fim de reduzir e prevenir a ocorrência de *Salmonella* spp. Dois programas merecem destaque, sendo eles o Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994) que, implantado no campo, teve como objetivo definir ações que possibilitem a certificação sanitária do plantel avícola nacional e favorecer a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo, e o Programa de Redução de Patógenos (BRASIL 2003) que busca o controle de contaminação através de análise laboratorial e sistemática das carcaças de frango e perus, a fim de criar um banco de dados com informações sobre a presença de *Salmonella*, realizar monitoramento constante e aumentar a inocuidade destes produtos.

Muitos sorovares de *Salmonella* exibem potencial zoonótico, em geral os sorovares mais prevalentes em aves também são os principais envolvidos em doenças de origem alimentar, ressaltando-se a importância dos produtos avícolas na salmoneloses em humanos (ANTUNES et al., 2003).

## 2.4 IMPORTÂNCIA DE *Salmonella* spp. EM SAÚDE PÚBLICA

Em humanos as doenças causadas por *Salmonella* podem ser divididas em três tipos: a febre tifóide (causada por *S. Typhi*), as febres entéricas (causada por *S. Paratyphi*) e as enterocolites ou salmonelose (demais sorovares) que, em alimentos,

merecem importância como causadoras de casos e surtos de ETA em todo o mundo, inclusive no Brasil.

Em geral, as salmoneloses não são graves cujos quadros são considerados de baixa ou média gravidade, onde indivíduos acometidos por outras doenças, ou imunologicamente debilitados, necessitam de maiores cuidados. Crianças acometidas com salmonelose também inspiram maiores preocupações, pois o patógeno pode invadir a circulação sanguínea provocando infecções em outros órgãos (TRABULSI et al., 1999).

Resultados de testes de alimentação em humanos indicam que a dose infectante de *Salmonella* que causa doença em 50% dos humanos saudáveis varia de  $10^5$  a  $10^9$  células, mas a mesma depende também do sorovar e da cepa de *Salmonella* envolvida (THOMAS, 2011). Segundo Blaser e Newma (1982) existem registros de surtos provocados por menos 10.000 células de *Salmonella*. No entanto existem relatos de ocorrência de doença com números ainda menores de células, de acordo com Poppe (1994) há evidências 10 a 1000 células de *Salmonella* possam causar doença em humanos e segundo a FDA cerca de 15 células de *Salmonella* já são suficientes para provocar doença em pacientes imunocomprometidos e/ou quando ingeridos com alimentos gordurosos (FDA/CFSAN, 2003).

Estudos recentes estimam que existam 80,3 milhões de casos anuais de doenças de origem alimentar relacionada com *Salmonella* em todo o mundo (MAJOWICZ et al., 2010). Dados publicados ECDC/EFSA (2012) revelam que apesar da redução no número de casos de salmonelose em 2010, na União Europeia, *Salmonella* manteve-se como o agente causal mais frequentemente relatado de surtos de origem animal, responsável por 30,5% de todos os surtos relatados.

Scallan et al.(2011) investigaram os principais patógenos causadores de doenças alimentares no período de 2000 a 2008 nos Estados Unidos e concluíram que *Salmonella* spp. foi responsável por 11% dos casos de ETA e por 35% das hospitalizações. Considerando que, a maioria dos casos de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalizações o número de casos provavelmente é subestimado, segundo Forsythe (2002), somente 10% do total de surtos de origem alimentar são notificados no Brasil.

Kottwitz et al. (2010) fizeram uma avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no Estado da Paraná, Brasil, durante o período de 1999 a

2008, e verificaram a ocorrência de 286 surtos. Alimentos a base de ovos, carnes e derivados, e produtos classificados como alimentos variados, foram responsáveis por 45%, 34,8% e 20,2% dos surtos, respectivamente.

Estudo de Painter et al., (2013) revela que *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Javiana*, *S. Newport* e *S. Typhimurium* foram os principais sorovares isolados em humanos nos Estados Unidos de 1998 a 2008. E na União Europeia *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorovares mais prevalentes, segundo dados do EFSA (2013).

Atualmente, do ponto de vista epidemiológico, o sorovar *Enteritidis* tem ganhado maior destaque, uma vez que os dados o associam como principal causa de salmonelose em humanos, (SOARES, 2012). A partir de 1993, *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema de saúde pública no Brasil, visto que raramente era isolado de infecções humanas até 1990. Desde então sua prevalência tem aumentado e passou a corresponder mais de 60% dos sorovares isolados do Instituto Adolfo Lutz, a partir de 1995 (SILVA e DUARTE, 2002).

Por sua alta incidência em aves, e o elevado consumo desta carne é facilmente introduzida na cadeia alimentar humana (TESSARI, et al., 2008). As carcaças de frango bem como seus cortes e outros derivados chegam ao momento do preparo culinário com percentuais de contaminação que são preocupantes. Desse modo, cabe ao consumidor ou aquele que irá preparar o prato pronto tomar medidas higiênicas e tecnológicas que minimizem a possibilidade de permanência de *Salmonella* no alimento. Em geral nos alimentos a dose é baixa, mas condições inadequadas de resfriamento, estocagem ou cozimento insuficiente podem provocar a multiplicação do patógeno até níveis capazes de causar ETA, por isso há importância do controle de temperaturas e formas de manipulação em todo o processo produtivo.

Duas vias comuns de exposição humana a *Salmonella* na carne de frango têm sido apontadas como principais para a ocorrência de casos ou surto sendo elas, a contaminação cruzada e o sub processamento térmico.

Durante os processos de manipulação a contaminação cruzada pode facilmente ocorrer entre os alimentos manipulados (SOARES et. al, 2012) e, desse modo, permitir a permanência do patógeno viável. Na cocção, temperaturas altas ocorrem na superfície externa da carne eliminando provavelmente as bactérias que estão nessa região, entretanto caso tenha ocorrido à penetração do patógeno para

porções mais internas, poderão sobreviver (LUBER, 2009). Este fenômeno ocorre por estarem às células vegetativas do micro-organismo fisicamente protegidas nas porções mais centrais do tecido chamadas “cold points” e, desse modo, podendo provocar ETA. Segundo Cogan et al. (2002) de 40 a 60% dos casos de ETA são esperadas de se originar nos domicílios envolvendo sub-cozimento da carne e contaminação cruzada. Talvez, como consequência a esses fatores, dados apontam que no Brasil e na União Europeia o local de maior ocorrência de ETA são as residências (BRASIL, 2009; ECDA/EFSA, 2012).

Para tanto a ANVISA aprovou em 2001 a Resolução RDC nº 13 e passou a exigir que as indústrias que comercializam carnes de aves insiram nos rótulos dos seus produtos informações sobre as formas adequadas para uso, preparo e conservação, conscientizando indiretamente os consumidores da possibilidade da presença de contaminantes biológicos causadores de doença, neste caso subentendendo-se a presença de *Salmonella* e do risco aos quais estão expostos caso não manuseiem corretamente o produto.

## 2.5 DESENVOLVIMENTO DE *Salmonella* spp. EM CARNE DE AVES

Não há dúvidas sobre a importância do Brasil na produção mundial de carne de frango. Adicionalmente o país se destaca internamente por um elevado consumo *per capita* quando comparado a outros países, com 47,38 kg/hab/ano em 2011 contra uma média de 23kg/hab/ano dos países da União Europeia, por exemplo. Independentemente destas informações é incontestável que é um alimento consumido mundialmente e que as mudanças da sociedade e as alterações nos hábitos alimentares têm obrigado às indústrias de processamento de aves oferecerem produtos cada vez mais práticos de serem consumidos, como por exemplo, produtos fracionados em pequenas quantidades como cortes congelados individualmente sem pele e sem osso de valor comercial agregado.

Para a produção destes cortes é necessária uma intensa manipulação da carcaça possibilitando a transferência da contaminação originalmente na superfície da pele e seus folículos da pena para os cortes nobres acarretando na possibilidade de aumento/manutenção da contaminação do produto final, principalmente por contaminação cruzada.

Durante e após o abate de aves a contaminação de *Salmonella* e concentra inicialmente nas superfícies da carne, normalmente na pele e os tecidos que se encontram logo abaixo dela se mantêm praticamente livres de bactérias por algum tempo. Contudo o patógeno pode gradualmente penetrar nos tecidos mais internos (JAY, 2005) dificultando nessas situações sua eliminação ou inativação.

Jordan et al. (2006), na Irlanda, analisaram a presença de *Salmonella* em carne bovina, suína, frango, peru, pato e ovina crua e após o cozimento. Os autores observaram que houve uma ocorrência de 1% de positividade de *Salmonella* no interior do tecido das amostras de carne crua mantendo-se esta contaminação em 0,1% das amostras após o cozimento convencionalmente aplicado, evidenciando a possibilidade de não haver destruição de *Salmonella*, mesmo após tratamento térmico.

Luber e Barlet (2007), na Alemanha, avaliaram a prevalência de *Campylobacter* na superfície e no interior de amostras de peito de frango, e concluíram que 87% das amostras apresentaram contaminação superficial e 20% de contaminação interna, sendo que todas as amostras que apresentaram contaminação interna também estavam contaminadas superficialmente, o que sugere penetração no tecido.

Não se sabe exatamente quais fatores estão envolvidos na penetração de *Salmonella* para o interior do músculo, bem como a rota de penetração utilizada para invadir o tecido, entretanto alguns fatores parecem ter uma importância especial.

O primeiro fator a ser considerado é a estrutura do tecido muscular. Com o desenvolvimento do *rigor mortis* alterações bioquímicas ocorrem no tecido muscular e são responsáveis por modificações na configuração estrutural do tecido. Heffron e Hegarty (1974) observaram que o diâmetro da fibra muscular diminui de 14% a 16% durante o desenvolvimento do *rigor mortis*, devido alterações bioquímicas, com aumento concomitante do espaço extracelular, sugerindo-se a possibilidade de que o patógeno penetre ativa ou passivamente por este espaço.

Thomas em McMeekin (1981) em estudo sobre a superfície de tecido muscular de frango observaram que a micrografia da fáscia do músculo antes da imersão em água ou solução salina foi significativamente diferente do músculo imerso nesta solução por trinta minutos. Depois deste período foi possível observar claramente a separação individual das fibras musculares como possível resultado da absorção de água pelo colágeno provocando inchaço e expansão das fibras dentro



do tecido conectivo. Outro estudo de Thomas, Rouke e McMeekin (1987) também constataram que altas quantidades de água podem aumentar a frequência de penetração, provavelmente por aumento da distância entre as fibras musculares, produzindo concomitantemente diminuição da resistência do movimento microbiano no tecido.

Gill, Leet e Penney (1984) também avaliaram as mudanças estruturais que se desenvolvem no tecido muscular bovino com o *rigor mortis* e a relação dessas mudanças com a penetração de *Pseudomonas fluorescens* no tecido, para isso, submeteram o tecido muscular a duas condições diferentes, uma em soluções hipotônicas e outra em soluções hipertônicas. Os autores verificaram que as fibras musculares em solução hipotônica tornavam-se túrgidas enquanto em soluções hipertônicas ocorria o oposto, encolhimento das fibras musculares criando-se lacunas entre a célula muscular e o endomísio circundante, oferecendo um caminho para invasão bacteriana, sendo que estas lacunas formadas serviram como rota para penetração de *P. fluorescens* através da carne bovina.

Alguns processos tecnológicos aos quais a carne é submetida podem influenciar na aceleração do processo de penetração bacteriana. O “tumbling” ou em tradução literal, tampleamento, é um processo utilizado para promover o amaciamento da carne, cuja agitação e sucessivos “tombos” realizados dentro de grandes cilindros de aço inoxidável podem conduzir a alterações estruturais na camada exterior da carne (DOLATA et al. 2004), por promover o rompimento de estruturas miofibrilares. Este processo geralmente é utilizado em conjunto com a marinação que consiste em acrescentar aos alimentos uma mistura de temperos numa solução, geralmente com água.

Moza et al. (2009), no Canadá, investigaram a penetração de *Salmonella* Enteritidis em peito de frango que estava em contato com uma marinada contaminada com este patógeno. Os peitos de frango foram submetidos a dois tratamentos, em um dos tratamentos os peitos de frango ficavam em contato com uma marinada contaminada com *S. Enteritidis* e eram submetidos ao tampleamento (6rpm/30 min.) e, no outro, ficavam em contato com a marinada contaminada e eram submetidos ao tampleamento manual em um intervalo de tempo de três minutos. Os autores verificaram penetração do patógeno em 89% e 44% das amostras de peito de frango em cada um dos tratamentos, respectivamente após 30 minutos. Segundo os autores nas amostras submetidas ao tampleamento automático as bactérias

penetram através de fendas iniciais no filé de peito de frango que provavelmente foram alargadas pelo processo em si. Já nas amostras que ficaram em marinada com tambleamento manual o patógeno teve acesso ao interior do músculo por um processo que envolve difusão e possivelmente mobilidade do micro-organismo.

Warson et al. (2008) avaliaram a penetração de *Salmonella* sp.. em peito de peru marinado e submetido ao tambleamento e confirmaram a existência de penetração, verificando que *Salmonella* sp.. migrou até 3 cm para o interior do músculo depois de 20 minutos a 4°C.

O segundo fator que pode estar envolvido na penetração de *Salmonella* para o interior do músculo diz respeito à microbiota autóctone deterioradora do substrato cárneo. Pelas evidências existentes, a microbiota autóctone deteriorante, especialmente micro-organismos proteolíticos é capaz de promover alterações gradativas de degradação nas estruturas do tecido muscular, acelerando o processo de penetração de *Salmonella* no tecido muscular (GILL e PENNEY, 1977). Estes autores comprovaram a penetração de bactérias proteolíticas tais como uma cepa com capacidade proteolítica de *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, penetraram em subamostras de carne de carne bovina 2cm<sup>2</sup> em 36h a 30°C.

As bactérias proteolíticas atuam quebrando, aparentemente, o tecido conectivo que recobre a fibra muscular, chamado endomísio, oferecendo uma rota para invasão microbiana. Neste caso, espécies de bactérias proteolíticas podem ganhar uma vantagem ecológica através da penetração, por ter acesso a um novo nicho com novos recursos disponíveis para a exploração, o que não seria acessível ou a disposição para outras bactérias, favorecendo assim sua multiplicação (NYCHAS et al., 2008).

Thomas, Rouke e McMeekin (1987) também encontraram resultado semelhante ao avaliaram a penetração de bactérias proteolíticas e não proteolíticas, móveis e não móveis em diferentes temperaturas (4, 10, 15, 20 e 25°C) em peito de frango. Os autores concluíram que as cepas proteolíticas penetraram no tecido mais rapidamente que as cepas não proteolíticas em todas as temperaturas, no entanto, as cepas não móveis independentemente da capacidade proteolíticas não tiveram capacidade de penetrar no tecido muscular sendo, dessa forma, a motilidade bacteriana outro fator muito importante na penetração bacteriana. Os autores também observaram uma relação direta entre temperatura de armazenamento e

penetração microbiana, sendo que a penetração aumentou em temperaturas de estocagem mais elevadas.

O terceiro fator envolvido no processo de penetração diz respeito à temperatura de armazenamento do tecido cárneo. A temperatura revela-se importante, pois, afeta diretamente a multiplicação microbiana, sendo desta forma uma excelente forma de controlar o desenvolvimento de micro-organismos, uma vez que todas as reações metabólicas dos micro-organismos são catalisadas por enzimas na dependência da temperatura (JAY, 2005). Assim a diminuição da temperatura atua aumentando a fase lag da curva do crescimento microbiano, retardando sua multiplicação (MATARAGAS et al., 2006).

Todavia, numa situação comercial os produtos podem estar sujeitos a uma ampla variação de temperatura durante os estágios de produção, armazenagem, distribuição e venda de cortes comerciais (BORCH et al., 1996). Em estudo realizado nos países do Sul da Europa foram verificados que 30% de alimentos refrigerados estavam acima de 10°C em refrigeradores domésticos e no Norte Europa, 5% estavam acima de 13°C no varejo, e 21% acima 10°C em domicílios (KENNEDY et al., 2005), mostrando em todos esses casos, temperaturas inadequadas na manutenção do alimento podem facilitar o desenvolvimento dos micro-organismos.

De acordo com Fletcher (2006) analisando a presença de *Salmonella* em carcaças de frango colhidas na indústria e no varejo observaram aumento de 21,6% na positividade de *Salmonella* nas amostras do varejo comparadas as da indústria, admite-se que temperaturas inadequadas de manutenção podem ter contribuído para este aumento.

Segundo a Portaria 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998), resfriamento é o processo de refrigeração e manutenção da temperatura entre 0°C a 4°C dos produtos de aves (carcaças, cortes ou recortes, miúdos e/ou derivados) com tolerância de 1°C medido na intimidade dos mesmos, portanto é dentro desta faixa de temperatura que os produtos cárneos devem ser mantidos.

Além disso, acredita-se que existem algumas características do próprio micro-organismo que podem ser fundamentais para o processo de penetração. A maioria dos sorovares de *Salmonella* apresentam capacidade de se mover, devido à presença de flagelos peritríquios e alguns também podem exibir capacidade proteolítica, podendo ter uma penetração ativa dentro do tecido muscular,

independentemente de outras condições ótimas que possam ser criadas no tecido muscular, nas condições competitivas da microbiota deteriorante ou da temperatura de armazenamento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE *Salmonella* sp. E MICROBIOTA DETERIORADORA EM PEITOS DE FRANGO SEM PELE E SEM OSSO EXPOSTOS A VENDA NO COMÉRCIO VAREJISTA

##### 3.1.1 Plano de amostragem e delineamento Experimental

Foram analisadas amostras de peitos de frango sem pele e sem osso, comercializados de forma refrigerada e expostos a venda no comércio varejista do município de Palotina, oeste do Estado do Paraná. A escolha do estabelecimento varejista foi totalmente aleatória.

##### 3.1.2 Obtenção das amostras

Foram utilizados 30 peitos de frango resfriados, adquiridos no mercado varejista no município de Palotina, que foram colhidos diretamente das gôndolas dos estabelecimentos comerciais, sob refrigeração, em embalagens íntegras e dentro do prazo de validade comercial. Os peitos foram transportados até o LACOMA em suas embalagens originais sob condições isotérmicas em caixas de isopor com gelo, e mantidas nestas condições até o início das análises. Os peitos de frango foram retirados das embalagens originais de forma asséptica, evitando o contato com a parte externa da embalagem ou com o ambiente. Nestas amostras foi realizada a pesquisa de *Salmonella* sp., e a quantificação de micro-organismos deteriorantes: psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, bactérias lácticas e *Pseudomonas* spp.

### 3.1.3 Quantificação de micro-organismos deteriorantes (UFC/g)

Para as quantificações de psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, bactérias láticas e *Pseudomonas* sp. foram obtidas assepticamente 25g das amostras de peito de frango, retirando-se porções de todas as regiões do peito, diluídas em 225 mL de solução salina 0,85% e homogeneizadas por dois minutos em homogeneizador de amostras tipo Stomacher (Seward™). Em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas retirando-se 1mL do homogenato e adicionando a 9mL de solução salina até a diluição desejada para cada micro-organismo pesquisado.

#### 3.1.3.1 Quantificação de psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos

Foram retiradas alíquotas de 100µL de cada uma das diluições até a diluição  $10^{-3}$ , semeadas em duplicata pela técnica “spread plate” em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA, Difco) e incubadas a 7°C durante 10 dias (DOWNES e ITO, 2001). Para verificação de psicrotróficos proteolíticos foram selecionadas placas contendo de 25 a 250 colônias, retiradas 30 colônias e transferidas para placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA, Difco) adicionados de 1% de leite desnatado à constituição do meio, e incubadas a 7°C durante 10 dias (DOWNES e ITO, 2001), foram consideradas psicrotróficos proteolíticos as colônias que apresentarem halos de lise da caseína, independentemente do diâmetro. Os resultados foram expressos em UFC/g do produto.

#### 3.1.3.2 Quantificação de bactérias láticas

Foram retiradas alíquotas de 1mL de cada uma das diluições obtidas até a diluição  $10^{-3}$  e semeadas em duplicata pela técnica “pourplate” em Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Oxoid), e incubados a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/72$  horas conforme Downes e Ito (2001). Dez colônias das placas com quantificação entre 30 e 300 colônias foram escolhidas para realização de coloração de Gram e teste de catalase. As culturas Gram positivas e catalase negativas foram consideradas confirmadas para bactérias láticas. Os resultados foram expressos em UFC/g.

### 3.1.3.3 Quantificação de *Pseudomonas* spp.

Foram retiradas alíquotas de 100µL da diluição  $10^{-1}$  e semeadas em duplicata em placas de Petri em Cefalotina sódica fusidato – ágar cetrimide (CFC, Difco) pela técnica “spread plate”. As placas foram incubadas a 25°C/44±4 horas. Colônias presumíveis de *Pseudomonas* foram confirmadas pelo teste de oxidase, as que apresentaram reação positiva para oxidase eram consideradas *Pseudomonas*. Os resultados foram expressos em UFC/g.

### 3.1.3.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foi obtida a unidade analítica de 25g das amostras, adicionadas a 225 mL de água peptonada tamponada (APT, Difco) e incubados a 37°C/18±2h. Após este período, 100µL do pré-enriquecimento foram transferidos para Caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS, Difco) e incubado a 41,5°C±1°C/24h±3h, e 1mL para Caldo Tetracionato Muller Kauffmann Novabiocina (MKTTn, Oxoid) e incubado a 37°C±1°C/24±3h. De cada cultivo em RVS e MKTTn foi retirada uma alçada e semeados pela técnica de esgotamento superficial com auxílio de alça de platina em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Himedia) e Agar Bismuto de Sulfito (BS, Difco) que foram incubados a 37°C±1°C/24±3h. Nas amostras em que se observou desenvolvimento de colônias típicas as mesmas foram selecionadas e semeadas em Ágar Nutriente (NA), as placas foram incubadas invertidas a 37°C±1°C por 24±3h. Seguiu-se a etapa de confirmação bioquímica com testes de crescimento em Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Oxoid), crescimento em Agar Lisina Ferro (LIA), teste de urease, teste de lisina descarboxilase, teste de Voges-Proskauer, teste de indol e teste de β- galactosidade (ISO 6579/2007). Nos isolados suspeitos para *Salmonella* spp. foi realizado o teste de soroaglutinação com o emprego do anti-soro polivalente flagelar e somático (PROBAC®).

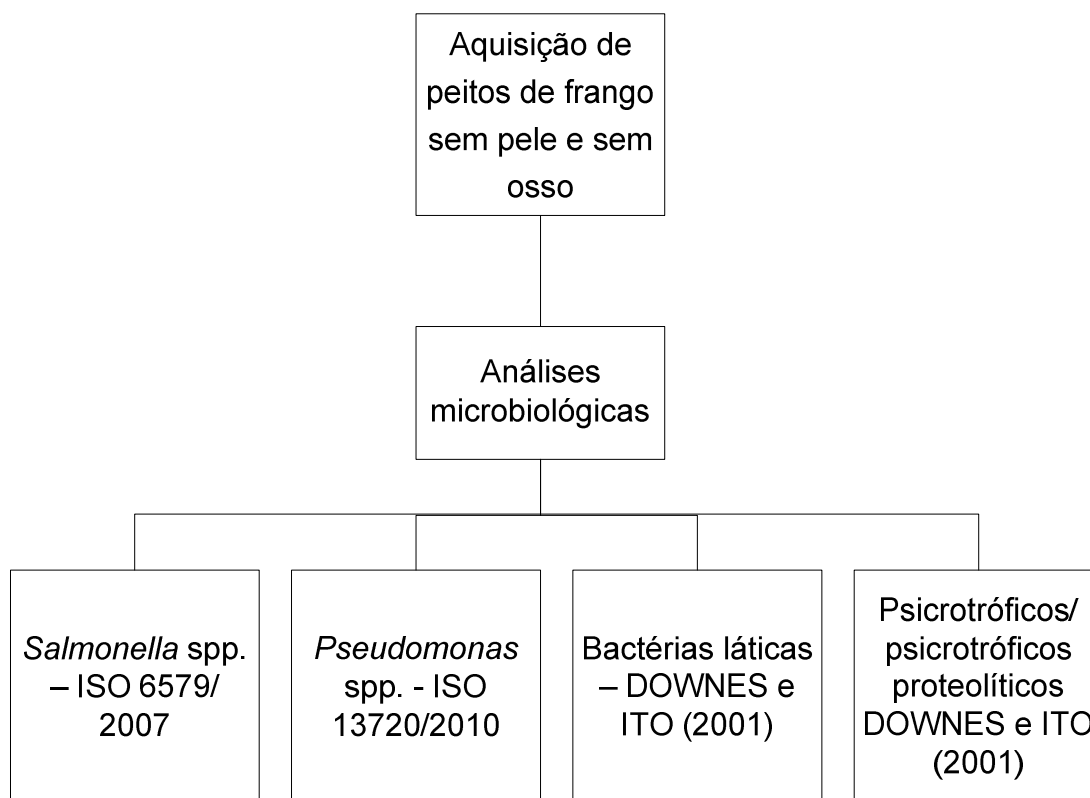


Figura 1. Diagrama das análises microbiológicas da investigação da microbiota deterioradora e *Salmonella* spp. de peitos de frango expostos a venda no comércio varejista.

### 3.2 ESTUDO DA PENETRAÇÃO DE *Salmonella* EM PEITOS DE FRANGO

#### 3.2.1 Plano de amostragem e delineamento Experimental

Para realização do experimento, foram realizadas seis repetições para cada um dos tratamentos por meio de um delineamento inteiramente casualizado sendo que para a casualização, os peitos de frango sem pele e sem osso foram divididos ao meio e fragmentados em subamostras de 3cm x 3cm x 3cm (A x L x C), estas unidades foram misturadas e escolhidas subamostras aleatoriamente.

Foram realizados dois tratamentos e o controle. O controle (C) consistiu em subamostras de peitos de frango onde não foi realizado nenhum tipo de inoculação, sendo utilizado para análise da microbiota naturalmente presente (*Salmonella* spp., psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, bactérias láticas e *Pseudomonas* spp.); o tratamento I consistiu em subamostras de peito de frango com inoculação de *S. Enteritidis* e o tratamento II consistiu no subamostras de peito de frango com



inoculação de *S. Enteritidis* e *Pseudomonas* spp., simultaneamente, conforme Tabela 2. As unidades experimentais corresponderam a partes dos peitos sem pele e sem osso.

As amostras de cada um dos tratamentos foram armazenadas em incubadora refrigerada tipo B.O.D., sob três condições de temperaturas controladas, 2°C, 7°C e 12°C, As análises microbiológicas foram realizadas em três intervalos de tempo, chamados de tempo um (T1 = 24 horas), tempo dois (T2 = 48 horas) e tempo três (T3 = 72 horas) (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos, temperaturas e tempos de armazenamento realizados nas subamostras de peito de frango sem pele e sem osso.

Tratamento	Descrição do tratamento	Temperaturas de estocagem	Tempos de estocagem
<b>C</b>	Peito de frango não inoculado (controle)	2°C, 7°C, 12°C	24h, 48h, 72h
<b>I</b>	Peito de frango inoculado com <i>Salmonella</i> Enteritidis	2°C, 7°C, 12°C	24h, 48h, 72h
<b>II</b>	Peito de frango inoculado com <i>S. Enteritidis</i> e <i>P. fluorescens</i>	2°C, 7°C, 12°C	24h, 48h, 72h

### 3.2.2 Descrição das amostras e subamostras de peito de frango

Foram utilizados cortes *in natura* de peitos de frango, sem pele e sem osso, submetidos ao processamento em “tumbling” com adição de solução com 1,5% de sal comercial. Estes cortes foram obtidos diretamente da indústria de abate e processamento de aves habilitada para exportação; Os peitos de frango foram transportados até o laboratório em condições isotérmicas e mantidos em temperatura inferior a -18°C até a utilização.

As amostras de peitos de frango foram descongeladas *overnight* em geladeira. No momento do preparo das subamostras foi realizada uma desinfecção superficial dos mesmos com algodão embebido com álcool 70%. Os peitos de frango foram colocados sobre uma tábua de corte e divididos assepticamente, com auxílio de uma faca, régua e moldes estéreis. Para dividir as subamostras utilizou-se régua de plástico esterilizada e moldes de nove cm<sup>2</sup> do mesmo material, também estéreis.

Com auxílio da régua mediu-se a espessura do peito do frango que deveria apresentar altura igual a 3cm. Porções com espessuras inferiores foram descartadas. Os moldes 3cm x 3cm foram colocados sobre o peito, para garantir as dimensões do comprimento e largura. Em seguida, com auxílio de uma faca, era feito o corte, originando subamostras com: 3cm x 3cm x 3cm (C x L x A) (Figura 2). Estas subamostras foram acomodadas dentro de bandejas de plástico desinfetadas com álcool 70% e mantidas sob refrigeração até o momento da inoculação.

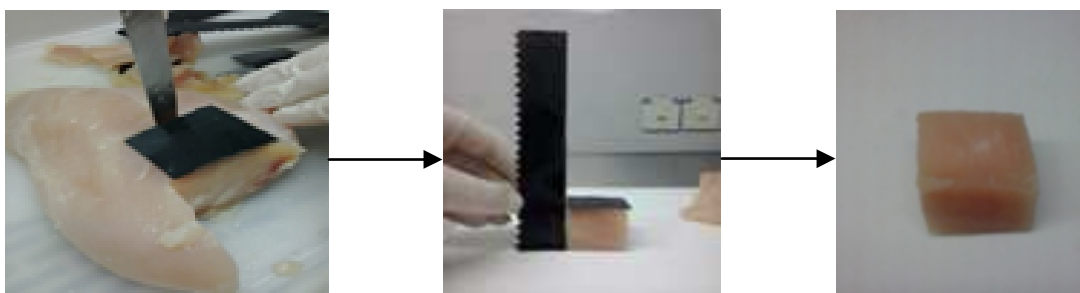


Figura 2. Fragmentação dos peitos de frango em subamostras.

### 3.2.3 Preparo do cultivo de *Salmonella* Enteritidis e padronização do inóculo

No presente trabalho foi utilizada uma cepa *Salmonella* Enteritidis de origem aviária e resistente ao Ácido Nalidíxico (NAL<sup>+</sup>) na concentração de 100 µg, cedida pelo Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Botucatu, SP. A cepa foi mantida em ágar conservação e sob refrigeração, até o momento de sua utilização.

Com o objetivo de verificar o padrão de crescimento foi retirada uma alçada da cultura em ágar conservação e transferida para erlemeyer contendo 100 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI – Difco) que foram acomodadas em Shaker (Shaker-orbital OS-10 BIOSAN®) e incubadas a 35°C/18-24h. A partir deste cultivo foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% até a diluição 10<sup>-10</sup>, em seguida 100µL de cada uma das diluições foi semeada em placas de Petri contendo ágar PCA, através da técnica “spread plate”, e incubado 35°C/24h. Após este período foi realizada a contagem das colônias para a escolha da diluição que fornecesse 1000 UFC em 500 µL, volume escolhido para a contaminação superficial das subamostras de peito de frango utilizado nos tratamentos I e II.

### 3.2.4 Preparação do inóculo de *Pseudomonas fluorescens*

Foi utilizada uma cepa de *Pseudomonas fluorescens* (IAL 2049) adquirida do Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo- na forma liofilizada que foi reativada conforme instruções fornecidas pelo IAL. Depois de reativada a cultura foi mantida em ágar conservação, sob refrigeração, até o momento de sua utilização. Para preparação do inóculo foi retirada uma alçada da cultura em ágar conservação e transferida para erlemeyer com 100 mL de caldo BHI, acomodados em aparelho Shaker (Shaker-orbital OS-10 BIOSAN®) e incubadas a 30°C/ 18-24h. A partir deste cultivo foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% até a diluição  $10^{-10}$ , em seguida 100µL de cada uma diluições foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA, Difco) e incubadas a 30°C/ 48h. Após este período foi realizada a contagem de UFC das placas para verificação de qual diluição mais se aproximava de 1000 UFC em 500µL volume escolhido para a contaminação superficial das subamostras de peito de frango no tratamento II.

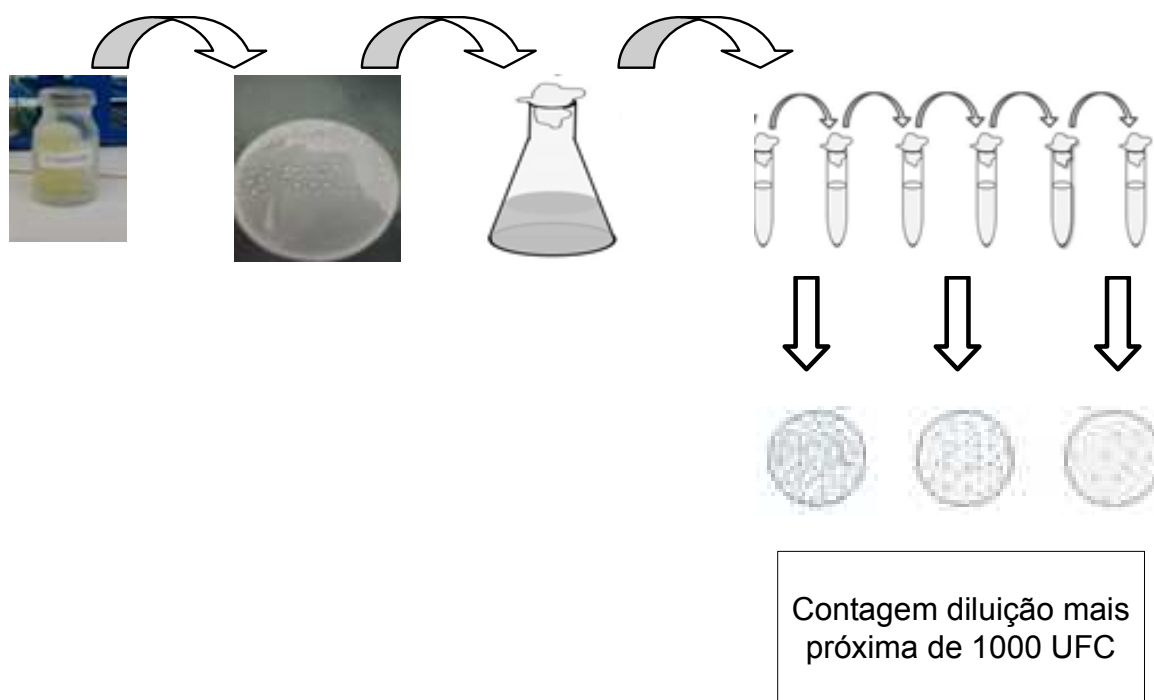


Figura 3. Procedimento de padronização dos inóculos de *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas fluorescens*.

### 3.2.5 Inoculação de *Salmonella* Enteritidis nas subamostras de frango (tratamento I)

Para contaminação das subamostras de peito de frango alíquotas de 500µL do inóculo contendo uma quantidade de referência de 1000 UFC, conforme descrito no item 3.2.3, foram dispensadas em uma placa de Petri estéril sobre a qual foram depositadas as subamostras de peito de frango com auxílio de uma pinça estéril, sendo que somente a porção inferior das subamostras de peito de frango entrou em contato com o inóculo. Estas placas foram identificadas de acordo com o tratamento ao qual pertenciam, acomodadas dentro de bandejas de plástico e incubadas nas temperaturas e pelos tempos pré-determinados (Figura 4).

### 3.2.6 Inoculação de *S. Enteritidis* e *Pseudomonas fluorescens* nas subamostras de frango (tratamento II)

Para contaminação das subamostras de peito de frango foram preparados inóculos de *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas fluorescens*, contendo uma quantidade de referência de 1000 UFC para cada grupo microbiano, como descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4. Para contaminação das subamostras de peito de frango alíquotas de 100µL de cada um dos inóculos foram dispensados em uma placa de Petri estéril sobre a qual foram depositadas as subamostras de peito de frango com auxílio de uma pinça estéril, sendo que somente a porção inferior das subamostras de peito de frango entrou em contato com o inóculo. Estas placas foram identificadas de acordo com o tratamento ao qual pertenciam, acomodadas dentro de bandejas de plástico e incubadas nas temperaturas e pelos tempos pré-determinados (Figura 4).

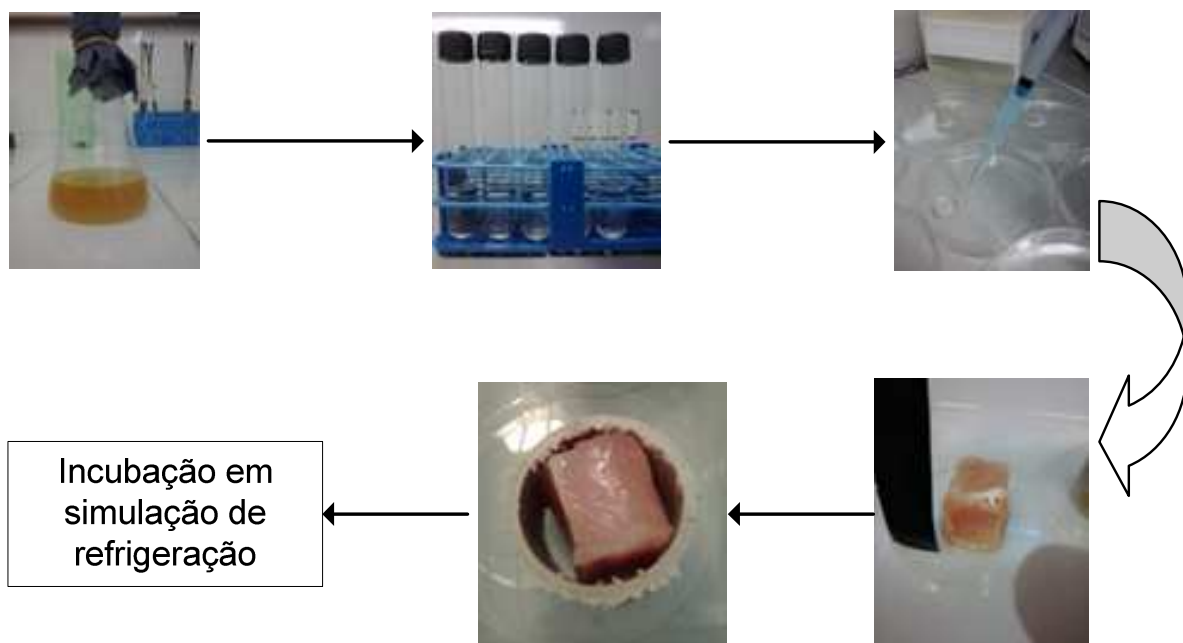


Figura 4. Inoculação de *S. Enteritidis* (tratamento I) e *S. Enteritidis* e *P. fluorescens* (tratamento II) nas subamostras de peito de frango.

### 3.2.7 Confirmação dos inóculos de *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas* fluorescens

Para confirmação dos inóculos utilizados nos tratamentos I e II foram retirados 100µL da diluição utilizada ( $10^{-5}$ ) da cultura de *S. Enteritidis* e de *P. fluorescens* e semeada individualmente em placa de Petri com Ágar Padrão para Contagem Total (PCA, Difco) incubados a 35°C/24h e 25°C/48h, respectivamente. Decorrido este tempo era feito a contagem de colônias, a qual deveria estar próxima de 1000 UFC. Este procedimento foi realizado em todas as repetições.

### 3.2.8 Avaliação da penetração de *Salmonella* Enteritidis nas subamostras de peito de frango armazenadas em diferentes condições de temperatura

Foi realizada a avaliação da penetração de *S. Enteritidis* nos tempos T1, T2 e T3, nas subamostras de peito de frango, sendo duas amostras do controle (C), duas com inoculação de *S. Enteritidis* (Tratamento I) e duas do tratamento com inoculação de *S. Enteritidis* e *P. fluorescens* (Tratamento II), para cada temperatura, sendo uma das amostras de cada tratamento destinada à análise da penetração de

*S. Enteritidis* e a outra à análise dos micro-organismos deteriorantes (psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, bactérias lácticas e *Pseudomonas spp.*). Sendo que a avaliação da penetração de *S. Enteritidis* foi realizada observando a penetração do patógeno em um sentido, ou seja, da superfície que esteve contato com o inóculo em direção a porção que não esteve em contato com o inóculo (Figura 5). As subamostras foram retirados das bandejas onde estavam incubados e colocados dentro de uma bacia de inox estéril, dentro de fluxo laminar para realização da segmentação dos subamostras. Os subamostras foram subdivididos em três segmentos com um cm cada, ou seja, o segmento superficial (Base) que esteve em contato com o inóculo, o segmento médio e o segmento distal (Topo) os quais foram seccionados sob condições assépticas com auxílio de uma faca e régua estéreis. Em seguida foram colocados dentro de sacos plásticos estéreis para Stomacher, identificados com o número de segmento, bloco e temperatura em que estiveram incubados e, então, destinados a análise de *S. Enteritidis* e micro-organismos deteriorantes (Figura 6).

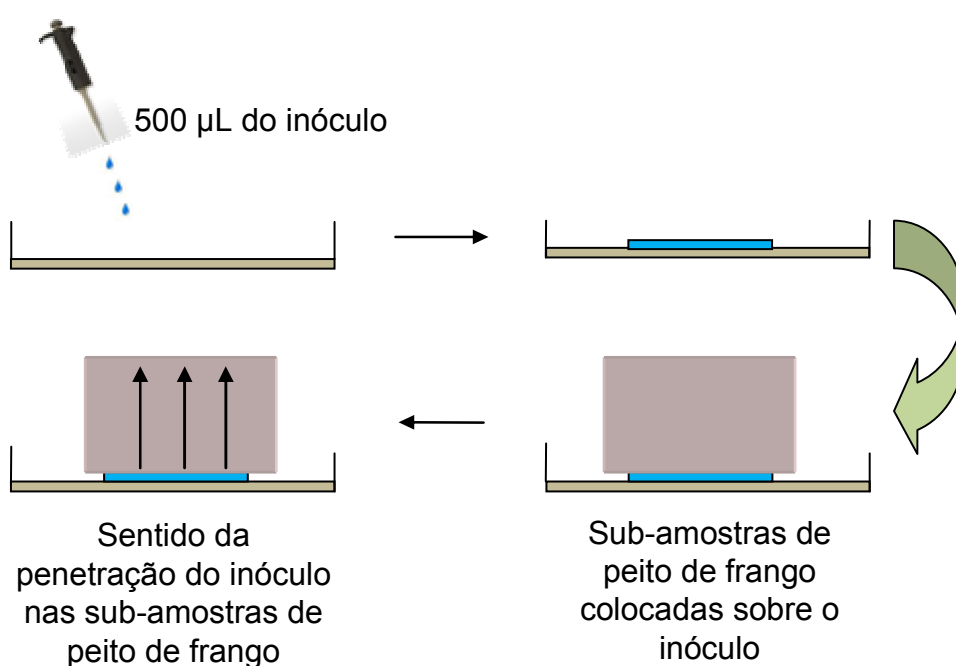


Figura 5. Esquema contaminação das subamostras de peito de frango e sentido da penetração de *Salmonella* Enteritidis.

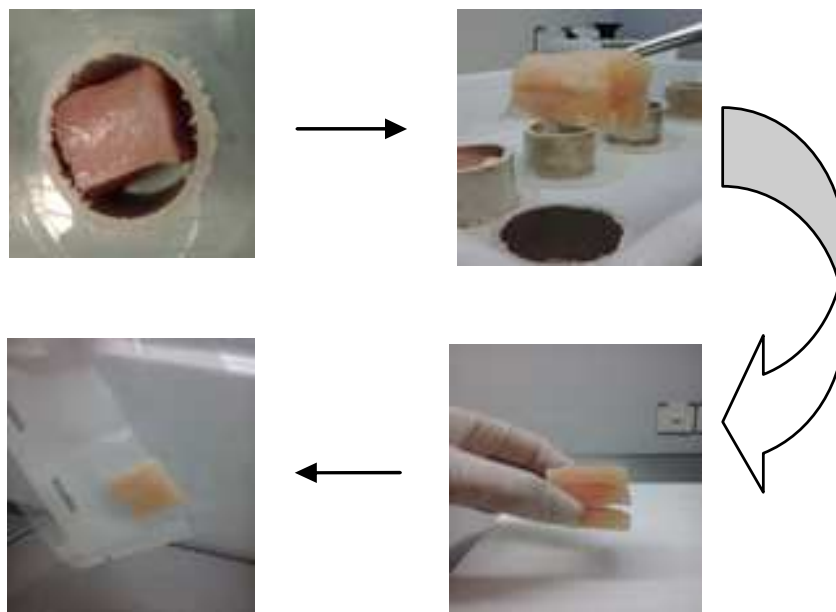


Figura 6. Divisão das subamostras de peito de frango em segmentos de 1 cm.

A verificação da penetração de *S. Enteritidis* nos três fragmentos (base, médio e topo) foi realizada pela contagem de *Salmonella* e pela presença ou ausência por fragmento.

Os segmentos foram pesados e colocados individualmente em sacos plásticos estéreis contendo água peptonada tamponada 0,1% (APT, Difco) numa proporção final de 1:10, homogeneizados em Stomacher (Seward®) por dois minutos.

Para contagem de *Salmonella* Enteritidis, após a homogeneização era retirada uma alíquota de 100µL que era semeada em placas de Petri contendo Ágar Bismuto Sulfito (BS, Difco) adicionados de Ácido Nalidíxico (NAL<sup>+</sup>) na concentração de 100µg/mL, pela técnica “spread plate” e incubado a 35°C/24h, após esse período era realizado a contagem das colônias que haviam se desenvolvido e calculado o número de UFC por Grama de fragmento.

Para a pesquisa de *Salmonella* (presença/ausência) o restante da amostra de pré-enriquecimento era incubado a 37°C/18±2h, seguiu-se o protocolo da ISO 6579/2007 (modificado) conforme descrito no item 4.1.3.4 tendo sido adicionado aos ágar de plaqueamento seletivo-diferencial o NAL<sup>+</sup> numa concentração de 100µg/mL.

### 3.2.9 Quantificação de *Pseudomonas fluorescens* inoculada e da microbiota deterioradora autóctone

Após a fragmentação dos subamostras de peito de frango em segmentos de 1 cm, cada segmento foi pesado e colocado individualmente em saco plástico estéril contendo Solução Salina 0,85% numa proporção final de 1:10 e homogeneizadas em Stomacher (Seward®) por dois minutos. Em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas até a diluição de  $10^{-3}$ , para cada segmento da subamostra de peito frango (base, meio e topo). A Quantificação de *Pseudomonas spp.* seguiu a mesma metodologia descrita no item 4.1.3.3. Para o cálculo da população foi considerado o somatório da cultura inoculada com a possível presença de *Pseudomonas spp.* naturalmente contaminante.

## 3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A média das contagens para cada tratamento (I e II), temperatura de estocagem (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e para cada segmento da subamostras (base, meio e topo) foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) para verificar as diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) utilizando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK).



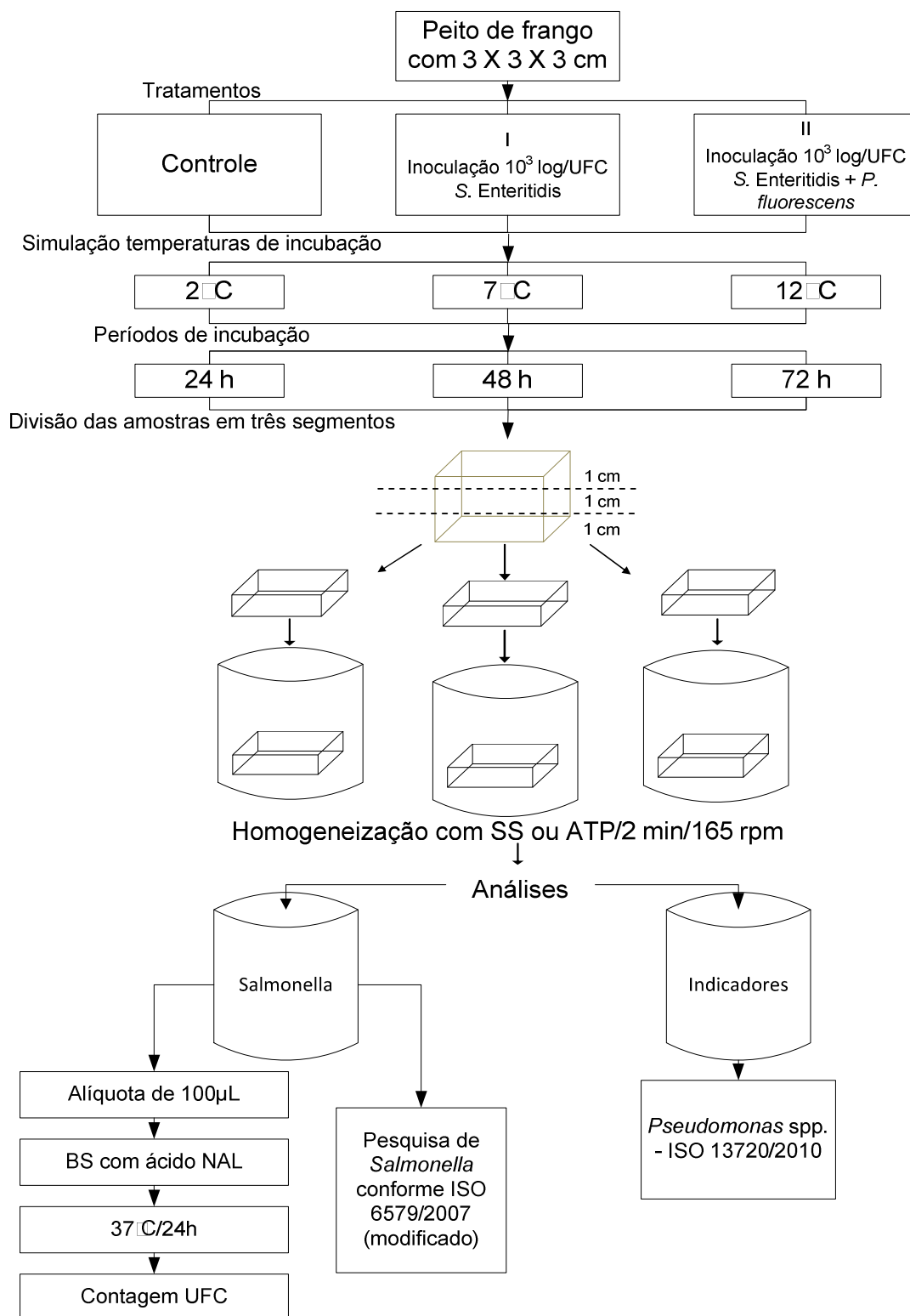


Figura 7. Diagrama da investigação da penetração de *Salmonella* Enteritidis em peitos de frango expostos a diferentes condições de temperatura.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 amostras de peitos de frango refrigerados sem pele e sem osso duas (6,6%) foram positivas para *Salmonella* spp.. Cabe destacar que as duas amostras positivas para *Salmonella* apresentaram contagens de indicadores muito abaixo das médias obtidas, o que pode estar relacionado a uma menor competição com o patógeno e, conseqüentemente, permitindo sua presença e favorecendo seu isolamento (Tabela 3).

Tabela 3. Médias das contagens *Pseudomonas* spp., BAL, Psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em log/UFC/g nas amostras de peito de frango com e sem presença de *Salmonella* spp. obtidas do varejo da cidade de Palotina – PR.

	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bactérias láticas	Psicrotróficos	Psicro. proteolíticos
Amostras - <i>Salmonella</i>	ND	4,77	5,60	3,50
Amostras + <i>Salmonella</i>	ND	2,30	2,54	2,38

ND = Não detectado

Nos cortes analisados, a contagem média de psicrotróficos e BAL foi, respectivamente,  $4,9 \times 10^5$  UFC/g e  $5,9 \times 10^4$  UFC/g, dessa forma, os resultados indicaram níveis de contaminação não muito elevados, o que coloca sugere processamento de obtenção bem como da conservação do produto adequado, assegurando a qualidade microbiológica do produto. Contudo, nas duas amostras em que foi obtido o isolamento de *Salmonella* spp., as contagens de psicrotróficos e BAL foram, respectivamente,  $3,5 \times 10^3$  e  $2,1 \times 10^2$  UFC/g.

As contagens de psicrotróficos foram semelhantes às encontradas por Carvalho et al.(2005) que analisando cortes de frango como coxa, sobrecoxa, fígado, moela, peito empanado observaram uma variação entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g.

Em nenhuma das amostras analisadas foi possível quantificar *Pseudomonas* spp., um psicrotrófico aeróbio com efeito deteriorante comumente presente em carne de aves refrigeradas. Resultados estes diferentes dos encontrados por Penteado e

Esmerino (2011) que confirmaram a presença de *Pseudomonas* spp. em 70% das amostras de carne de frango analisadas. E de Mellor et al. (2011) que verificaram contagens variando entre 2,3 log UFC/g a 7,4 log UFC/g durante os sete dias de realização do estudo.

Observou-se que a microbiota autóctone estudada pareceu não ter influência sobre a presença de *Salmonella* sp.. em peitos de frango refrigerados e que as condições higiênico-sanitárias dos mesmos apresentaram-se satisfatórias, com contagens baixas de indicadores.

Estudos confirmaram a presença de *Salmonella* spp. em cortes de frango. Capita et al., (2003) analisaram a incidência de *Salmonella* em produtos avícolas na Espanha, incluindo carcaças de frango, cortes como asa, coxa, fígado, coração e produtos de frango processados (linguiça e hambúrguer), e verificaram que 40% dos cortes estavam contaminados. Os autores enfatizaram que a elevada contaminação dos cortes pode ser resultado de contaminação cruzada com regiões da carcaça mais contaminadas, como a pele, ou o ambiente de manipulação.

Ruban et al. (2010), na Índia, isolaram *Salmonella* em cortes de frango em abatedouros avícolas e encontraram prevalência de 31,9% das amostras de peito de frango analisadas.

Ribeiro et al., (2007) em estudo realizado no Brasil analisando a presença de *Salmonella* em cortes de frango, verificaram 39,9% de amostras positivas tendo sido o sorovar Enteritidis identificado em 84% das cepas isoladas.

Kell e Picolli (2008) avaliaram a presença de *Salmonella* sp.. em carcaças, cortes comerciais e vísceras de frango resfriadas em abatedouro no Estado do Rio Grande do Sul e encontraram uma frequência de 10% de amostras positivas entre as carcaças, peito, filé de peito, asa, coxa com sobrecoxa, fígado e moela analisados, além de uma frequência de 30% das amostras de coração.

Carvalho e Cortez (2005) analisaram a frequência de *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças de frango, cortes de peito de frango, coxa e sobrecoxa em um abatedouro avícola do Estado de São Paulo e encontraram positividade de 13,3%, 15%, 16%, 30% e 13,3% para cada um dos itens analisados, respectivamente.

Estes resultados comprovam que *Salmonella* spp. continua sendo um grande problema para a indústria avícola mesmo sendo encontrado em percentuais

variáveis e enfatizam a necessidade de constantes estudos e busca de métodos mais eficazes para o controle deste patógeno.

Com relação ao estudo da penetração da *Salmonella* Enteritidis nas subamostras de peito de frango, quando foi empregada a técnica de contagem de *Salmonella* por fragmento os resultados variaram, tanto para o tratamento I quanto para o II, não tendo sido possível realizar a quantificação em todas as combinações de tempo e temperatura de estocagem mostrando que a penetração ocorre, mas em velocidade distinta.

Verifica-se na Tabela 3a 4 que nas subamostras de peito de frango estocados a 2°C foi possível quantificar *Salmonella* após 24 horas somente na base (Tratamento I) e na base e no meio (Tratamento II). Em 48 e 72h de estocagem, recuperou-se *Salmonella* dos segmentos base e meio, não sendo possível recuperar *Salmonella* do segmento topo. Nos subamostras que ficaram incubados a 7°C, o comportamento foi muito semelhante, onde depois de 24 h já foi possível recuperar *Salmonella* de todos os segmentos da base e meio. O mesmo aconteceu depois de 48h e 72h, sem contagens no topo para ambos os tratamentos. No entanto o comportamento de *Salmonella* foi diferente nas amostras que ficaram incubadas a 12°C, onde mesmo após 24 horas já foi possível recuperar *Salmonella* em todos os segmentos (Tratamento I) fenômeno também observado no Tratamento II, com exceção do segmento topo em 24 horas. Estes dados permitem dizer que nestas temperaturas o patógeno tem capacidade de migrar mais rapidamente.

Na comparação entre os tratamentos I e II não houve variação estatística significativa quando foram avaliadas as mesmas condições de temperatura, tempo e segmento [ $F_{(39, 148)}=6,53$ ,  $p<0,05$ ] (Tabela 4). Dessa forma, acredita-se que a microbiota deterioradora principalmente *Pseudomonas fluorescens* inoculada, não tenha exercido influência sobre a penetração de *Salmonella* Enteritidis. No entanto não foram realizadas avaliações histológicas, da topografia do tecido muscular para verificar se os micro-organismos deteriorantes foram capazes de alterar a estrutura tecidual mesmo em baixos níveis.

Exceção a essas informações foram os resultados encontrados em estocagem por 24 horas onde a recuperação de *Salmonella* ocorreu a 2°C no tratamento II, o que não foi observado no tratamento I. A 12°C em 24 horas houve recuperação o que não foi observado nas mesmas condições no tratamento I

(Tabela 4).Aparentemente a 2°C houve algum efeito da presença de *Pseudomonas* na penetração de *Salmonella* . Contudo, este aspecto não foi verificado a 12°C.

Tabela 4. Médias das contagens de *Salmonella* Enteritidis em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) e nos Tratamento I e II.

Temp.	Estoc.	Trat.	Segmento da sub-amostra		
			Base	Meio	Topo
2°C	24h	I	2,10 (± 0,21)	ND	ND
		II	2,09 (± 0,21)	2,0 (± 0)	ND
	48h	I	2,10 (± 0,24)	2,0 (± 0)	ND
		II	2,15 (± 0,25)	2,0 (± 0)	ND
	72h	I	2,20 (± 0,24)	2,0 (± 0)	ND
		II	2,34 (± 0,41)	2,0 (± 0)	ND
7°C	24h	I	2,16 (± 0,25)	2,10 (± 0,17)	ND
		II	2,37 (± 0,48)	2,0 (± 0)	ND
	48h	I	2,20 (± 0,24)	2,0 (± 0)	ND
		II	2,42 (± 0,44)	2,07 (± 0)	ND
	72h	I	2,36 (± 0,28)	2,07 (± 0)	ND
		II	2,56 (± 0,42)	2,15 (± 0,16)	ND
12°C	24h	I	2,36 (± 0,40)	2,60 (± 0)	2,0 (± 0)
		II	2,55 (± 0,45)	2,0 (± 0)	ND
	48h	I	2,95 (± 0,31)	2,30 (± 0,27)	2,40 (± 0,55)
		II	3,03 (± 0,19)	2,33 (± 0,31)	2,21 (± 0,48)
	72h	I	3,27 (± 0,20)	2,99 (± 0,27)	2,36 (± 0,40)
		II	3,32 (± 0,20)	2,74 (± 0,39)	2,41 (± 0,42)

ND = não detectado

Quando realizadas comparações dentro dos tratamentos individualmente percebeu-se diferença estatística significativa em alguns pontos [ $F_{(19,71)}=8,72$ ,  $p<0,05$ ] .No tratamento I comparando-se as contagens de *Salmonella* Enteritidis (Log UFC/segmento) entre os segmentos de uma sub-amostra (base/meio/topo) nas mesmas condições de temperatura e tempo verificou-se diferença significativa apenas entre os segmentos base e topo estocados a 12°C por 72 horas. E comparando-se o efeito da variação do tempo para o mesmo segmento na mesma temperatura verificou-se diferença significativa na base em 24 h e 72h na temperatura de armazenamento 12°C (Tabela 5). Estes resultados podem ser visualizados de forma ilustrativa na figura 8.

Tabela 5. Médias das contagens de *Salmonella* Enteritidis em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de armazenamento (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) no Tratamento I.

Temp.	Estoc.	Segmento da sub-amostra		
		Base	Meio	Topo
2°C	24h	2,10 ( $\pm$ 0,21) Aa	ND	ND
	48h	2,10 ( $\pm$ 0,24) Aa	2,0 ( $\pm$ 0) Aa	ND
	72h	2,20 ( $\pm$ 0,24) Aa	2,0 ( $\pm$ 0) Aa	ND
7°C	24h	2,16 ( $\pm$ 0,25) Aa	2,10 ( $\pm$ 0,17) Aa	ND
	48h	2,20 ( $\pm$ 0,24) Aa	2,0 ( $\pm$ 0) Aa	ND
	72h	2,36 ( $\pm$ 0,28) Aa	2,07 ( $\pm$ 0) Aa	ND
12°C	24h	2,36 ( $\pm$ 0,40) Ab	2,60 ( $\pm$ 0) Aa	2,0 ( $\pm$ 0) Aa
	48h	2,95 ( $\pm$ 0,31) Aa	2,30 ( $\pm$ 0,27) Aa	2,40 ( $\pm$ 0,55) Aa
	72h	3,27 ( $\pm$ 0,20) Aa	2,99 ( $\pm$ 0,27) Aa	2,36 ( $\pm$ 0,40) Ba

Letras maiúsculas diferentes nas linhas e letras minúsculas diferentes nas colunas significa  $p < 0,05$ . A avaliação nas colunas foi realizada individualmente para cada temperatura. ND = Não detectado.

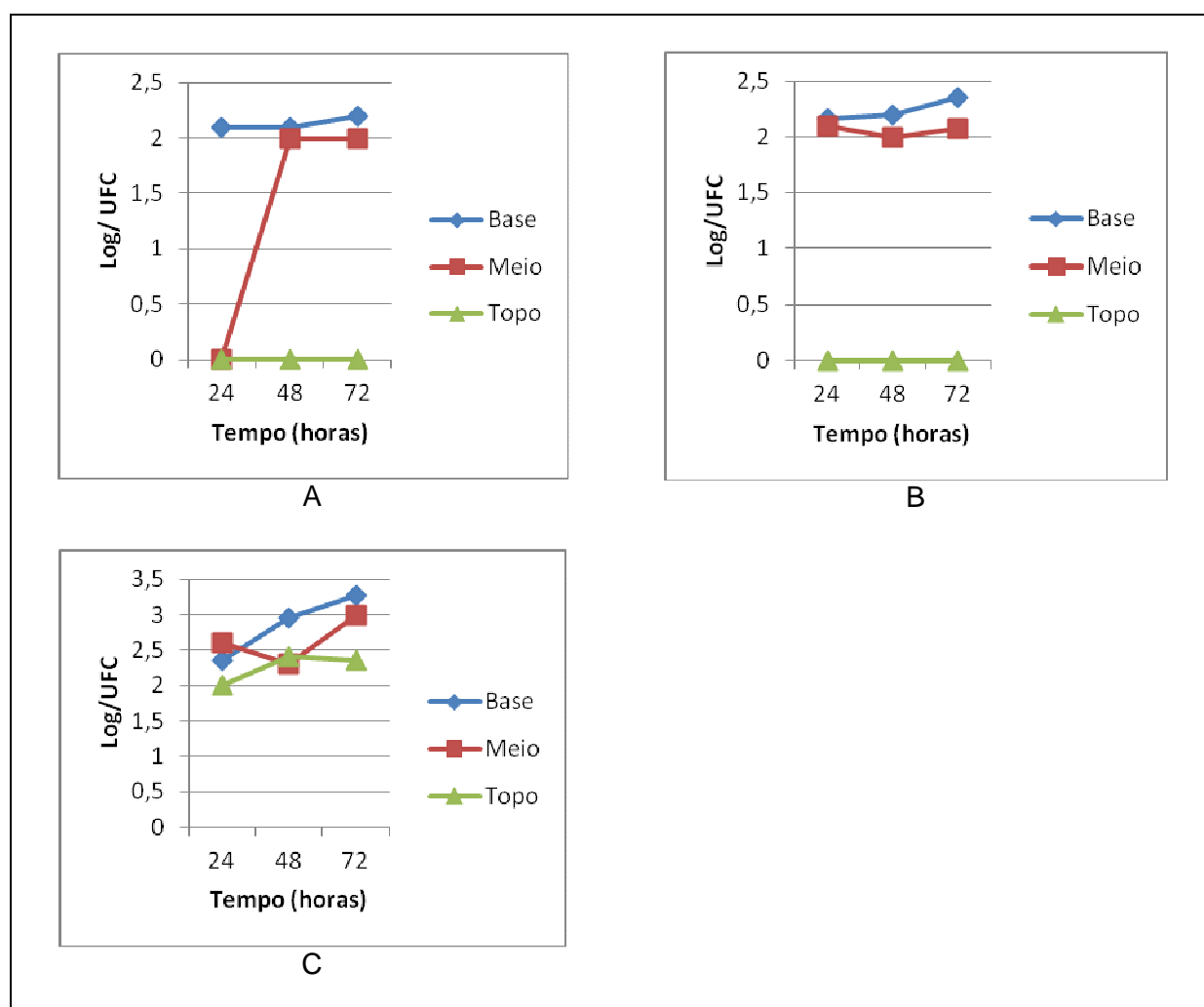


Figura 8. Penetração de *S. Enteritidis* a 2°C (A), 7°C (B) e 12°C (C) - Tratamento I em cada segmento da subamostra.

No tratamento II verificou-se diferença estatística nas contagens de *Salmonella* (Log de UFC/segmento) entre a base e topo incubados 12°C após 48 e 72 h [ $F_{(19,77)}=5,46$ ,  $p<0,05$ ]. Na comparação do mesmo segmento em tempos diferentes incubados na mesma temperatura, o resultado foi igual ao do tratamento I, com diferença significativa apenas entre as contagens do segmento base analisados em 24 h e 72h na temperatura de armazenamento 12°C (Tabela 6). Estes resultados estão ilustrados na Figura 9.

Tabela 6. Médias das contagens de *Salmonella* Enteritidis em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de armazenamento (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) no Tratamento II.

Temp.	Estoc.	Segmento da sub-amostra		
		Base	Meio	Topo
2°C	24h	2,09 ( ± 0,21) Aa	2,0 ( ± 0) Aa	ND
	48h	2,15 ( ± 0,25) Aa	2,0 ( ± 0) Aa	ND
	72h	2,34 ( ± 0,41) Aa	2,0 ( ± 0) Aa	ND
7°C	24h	2,37 ( ± 0,48) Aa	2,0 ( ± 0) Aa	ND
	48h	2,42 ( ± 0,44) Aa	2,07 ( ± 0) Aa	ND
	72h	2,56 ( ± 0,42) Aa	2,15 ( ± 0,16) Aa	ND
12°C	24h	2,55 ( ± 0,45) Ab	2,0 ( ± 0) Aa	N D
	48h	3,03 ( ± 0,19) Aa	2,33 ( ± 0,31) Aa	2,21 ( ± 0,48) Ba
	72h	3,32 ( ± 0,20) Aa	2,74 ( ± 0,39) Aa	2,41 ( ± 0,42) Ba

Letras maiúsculas diferentes nas linhas e letras minúsculas diferentes nas colunas significa  $p < 0,05$ . A avaliação nas colunas foi realizada individualmente para cada temperatura. ND = Não detectado.

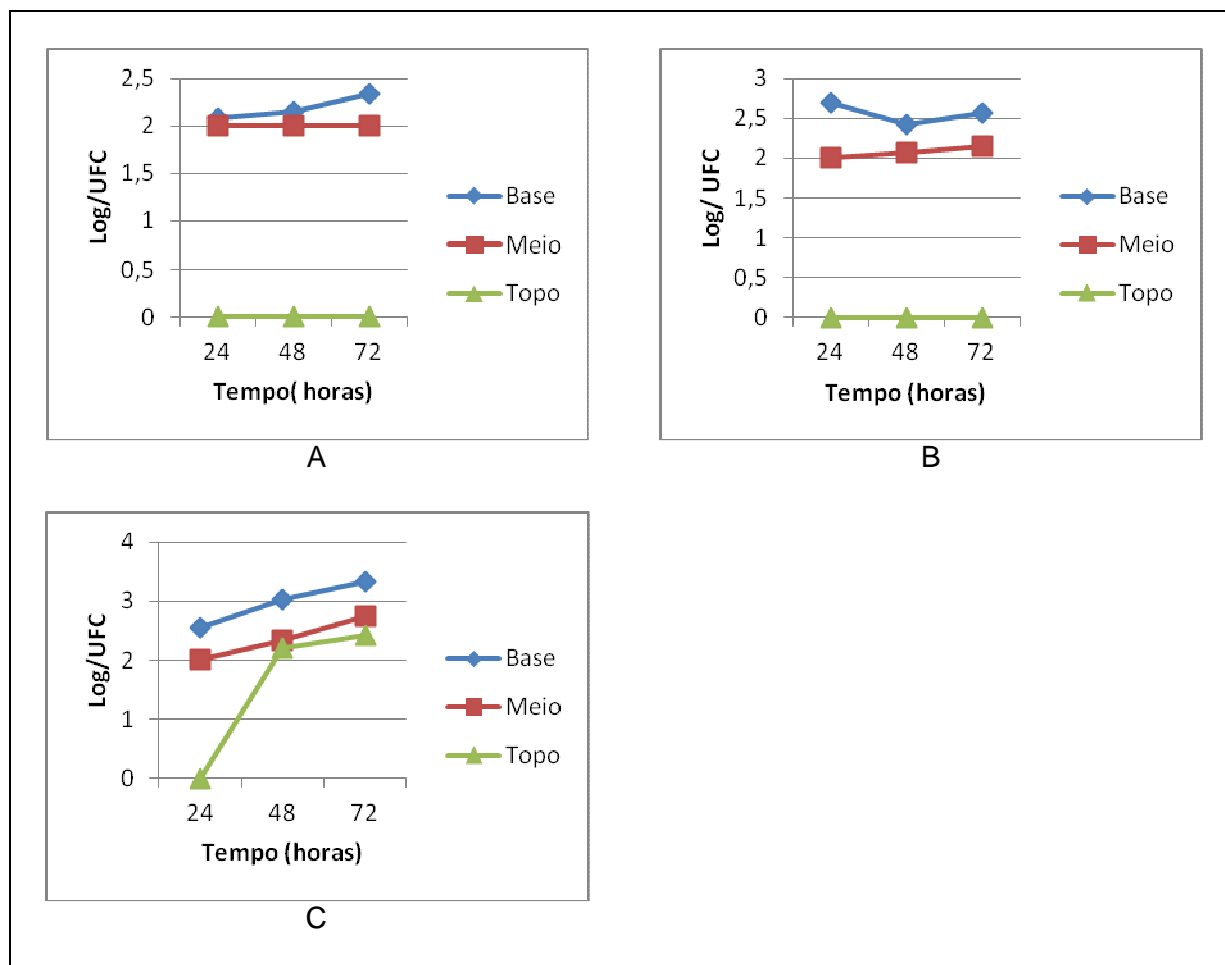


Figura 9. Penetração de *S. Enteritidis* a 2°C (A), 7°C (B) e 12°C (C) – Tratamento II em cada segmento das subamostras.

Pelos resultados obtidos, o efeito da temperatura foi significativo na penetração de *Salmonella*, sendo que, apenas nas amostras incubadas a 12°C foi verificada a penetração de *Salmonella* em toda a extensão da sub-amostra, ou seja, 3 cm de peito de frango, após 48h. As temperaturas de 2°C e 7°C podem ter exercido efeito deletério sobre a penetração de *Salmonella* Enteritidis fazendo com que o desenvolvimento do patógeno ficasse restrito aos segmentos da base e médio das subamostras de peito de frango.

Dessa forma, nossos resultados corroboram com os encontrados por Thomas et al., (1987) que ressaltam o efeito da temperatura sobre a penetração bacteriana, eles analisaram cinco condições diferentes de temperatura (4, 10, 15, 20 e 25°C) para a penetração de culturas de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Serratia marcescens* e verificaram que a penetração destes micro-organismos foi maior com o aumento da temperatura. Para Gill e Penney (1977) o tempo necessário para a penetração bacteriana foi dependente da temperatura de



incubação, sendo a penetração maior com o aumento da temperatura, estes autores verificaram que a taxa de penetração de *S. Typhimurium* foi de 10, 7 e 3cm por hora a 37, 30 e 20°C, respectivamente.

O conhecimento a respeito do efeito da temperatura sobre a penetração de *Salmonella* nos produtos de frango é importante, pois pode ajudar a indústria a prever com segurança os níveis de *Salmonella* durante o processamento e armazenamento (JUNEJA et al., 2007).

E mesmo que o controle da temperatura no processamento da carne de frango seja adequado para evitar o desenvolvimento microbiano às condições de temperatura durante o transporte, comercialização e armazenamento doméstico até o momento do preparo e consumo não são conhecidas. Temperaturas de abuso durante o armazenamento e processamento contribuíram com 19% dos surtos de doenças de origem alimentar de 1983 a 1990 em São Paulo, de acordo com Silva, (1997). Abusos na temperatura de armazenagem de alimentos também foram verificados por Kennedy et al. (2005) que encontraram irregularidades na temperatura de refrigeradores do varejo e domicílios em estudo da Europa.

A presença de *Salmonella* no interior de carnes pode aumentar a possibilidade de ocorrência de casos e surtos de ETAs, principalmente quando estes alimentos são indevidamente preparados e manipulados. O ambiente muscular interno propicia um aumento da resistência térmica de agentes patógenos microbianos (VELASQUEZ et al., 2010). Dessa forma o micro-organismo está fisicamente protegido nas porções mais centrais do tecido chamadas de “cold points” tornando mais difícil sua eliminação. Durante a fritura, cozimento ou outros procedimentos para carne temperaturas razoavelmente altas ocorrem na parte superficial da carne, eliminando as bactérias que estão nessa região, entretanto patógenos internos podem sobreviver (LUBER, 2009), dessa forma, o sub processamento térmico deixará micro-organismos viáveis nos alimentos, podendo causar doença diretamente pelo seu consumo ou contaminar outros alimentos, superfícies, equipamentos através de contaminação cruzada.

Jong et al., (2012) avaliaram a resistência térmica de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* na superfície de filé de peito de frango durante o cozimento em água fervente. Os filés de frango foram contaminados com os patógenos, armazenados *overnight* a 4°C e posteriormente cozidos, os autores perceberam que o tempo de redução decimal dos micro-organismos foi de 1,90, 1,97

e 2,20 minutos, respectivamente. No entanto, nas porções internas será requerido um tempo maior para a temperatura atingir valores capazes de eliminar as bactérias, desta forma, o tempo de cozimento precisa ser maior para provocar a morte de bactérias no interior do músculo, tornando o tempo de cozimento muito mais crítico do que do que se imagina.

Algumas características de *Salmonella* Enteritidis também podem ter contribuído para a penetração. *Salmonella* Enteritidis é móvel, assim como a maioria dos sorovares, e de acordo com estudo de Thomas et al., 1987 a motilidade bacteriana é muito importante para o processo de penetração. Em seu trabalho eles compararam a penetração bacteriana de cepas móveis (*Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens*) e não móveis (*Flavobacterium* spp. e *Acinetobacter* spp.) e verificaram que as cepas não móveis não tiveram habilidade de penetrar no tecido mesmo depois de sete dias incubados a 15°C.

Nós verificamos, acidentalmente, que esta cepa apresenta também capacidade proteolítica, o que também pode ter facilitado a penetração. Trabalhos como os de Thomas et al., (1987), e Nychas et al., (2008) ressaltavam a importância da atividade proteolítica na penetração de micro-organismos em carnes. Ambos os autores estudaram a penetração de bactérias proteolíticas e não proteolíticas em carne e verificaram que apenas as proteolíticas apresentaram capacidade de penetrar no tecido. Gill e Penney (1977) comprovaram a penetração de uma cepa proteolítica de *S. Typhimurium* em músculo bovino. Segundo estes autores quando as bactérias proteolíticas se aproximam de sua densidade máxima secretam proteases extracelulares que aparentemente degradam o tecido conectivo entre as fibras musculares, permitindo que as bactérias penetrem por estes espaços.

Além desses fatores as características do corte também podem ter facilitando a multiplicação e a penetração de *S. Enteritidis*. O corte de peito de frango utilizado neste trabalho foi submetido ao processamento de “tumbling” e teve adição de 1,5% de sal ainda na indústria. Warson et al. (2008) e Moza et al. (2009) comprovaram a penetração de *Salmonella* spp. em cortes de peito de frango e de peru submetidos ao tambleamento, pois este processo pode promover alterações estruturais na camada exterior da carne (DOLATA et al., 2004), promovendo o alargamento de fendas no tecido (MOZA et al. 2009) servindo de rota para penetração de *Salmonella*.

É importante ressaltar que embora a contaminação por *Salmonella* em frangos, na maioria dos casos, seja expressa na forma de presença/ausência, do ponto de vista de saúde pública, dados a respeito das contagens do patógeno no alimento ainda são significativas já que podem ser empregadas em avaliações de risco microbiológico (MEAD et al., 2010).

Não é possível encontrar na literatura muitos dados sobre análise quantitativa de *Salmonella*, no entanto estudo de Ghafir et al., (2010) verificaram que 1,3% das amostras de carne suína estavam contaminadas com 10 UFC/g de *Salmonella* e 7,4% das amostras apresentaram contaminação entre 1 a 10 UFC/g do patógeno.

Sendo importante destacar que mesmo em concentrações baixas *Salmonella* pode oferecer risco a saúde do consumidor podendo se multiplicar para níveis perigosos se surgirem condições adequadas como excesso de temperatura, por exemplo, (HANSEM, et al., 2010), como observado nos nossos resultados com aumento da temperatura aumentaram também as contagens do patógeno.

No entanto ao analisarmos os resultados do estudo da penetração de *Salmonella* através da técnica de presença/ausência nas subamostras observou-se que independentemente das temperaturas de incubação depois de 24 horas já era possível encontrar *Salmonella* em todos os segmentos do bloco em todas as temperaturas de incubação. Estes resultados indicaram que a cultura de *Salmonella* Enteritidis utilizada no estudo necessitou de menos de 24 horas para migrar três centímetros no tecido, mesmo na temperatura de 2°C, valor que pode ser considerado excelente sob o ponto de vista de conservação dos alimentos de maneira geral.

Sabe-se que as espécies de *Pseudomonas*, especialmente *P. fluorescences* se desenvolvem muito bem em alimentos refrigerados, sendo em muitos casos os principais deteriorantes desses alimentos. No entanto, pelos nossos resultados não foi possível o isolamento de *Pseudomonas* no controle e no tratamento I, e mesmo no tratamento II onde foi feita a inoculação do micro-organismo seu isolamento permaneceu baixo e na maioria das vezes restrito ao segmento que teve contato com o inóculo (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das contagens de *Pseudomonas* spp. em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) no tratamento II.

Seg.	Temperatura								
	2°C			7°C			12°C		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Base	2,00	2,00	2,30	2,00	2,00	2,00	2,00	2,70	2,95
Meio	ND	ND	ND	2,00	2,00	2,00	2,00	2,48	3,08
Topo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,00	2,00	2,60

ND = Não Detectado

Uma possível explicação para o baixo isolamento de *Pseudomonas* pode ser a competição microbiana por nutrientes e sítios de fixação que dificultam a multiplicação desse micro-organismo em detrimento de outros micro-organismos. De acordo com Raccach e Baker (1978), por exemplo, bactérias lácticas podem exibir ação inibitória sobre diversas espécies de *Pseudomonas*.

## 5 CONCLUSÕES

A prevalência de *Salmonella* sp. em peitos de frango sem pele e sem osso expostos a venda foi de 6,6%, o que permite dizer que os produtos de origem avícola, mesmo os mais nobres, podem expor a saúde da população quanto a presença deste importante patógeno. Nestas amostras as contagens de psicotróficos e psicotróficos proteolíticos e bactérias lácticas foram consideradas baixas, quando comparadas com a literatura citada.

Verificou-se uma variação no tempo de penetração de *Salmonella* para as técnicas empregadas no isolamento do patógeno. Quando avaliados os resultados da penetração de *Salmonella* através da técnica de quantificação pode-se concluir que a penetração do micro-organismo foi gradual sendo que a temperatura de 12°C mostrou-se mais favorável a penetração durante o armazenamento.

Com relação à técnica de presença ou ausência verificou-se penetração em toda a subamostra em todas as temperaturas e tempos de armazenamento.

Dos possíveis fatores associados à penetração de *Salmonella* Enteritidis concluiu-se que a temperatura exerceu efeito sobre o processo, sendo que as mais elevadas utilizadas no estudo mostraram-se favorecer a penetração. Este processo se tornou mais evidente ao passar do tempo.

A presença de *Pseudomonas fluorescens* inoculada não exerceu influência na penetração de *Salmonella* Enteritidis nas condições experimentais do presente estudo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, comprovada a penetração de *Salmonella* Enteritidis em peito de frango mesmo em temperaturas de refrigeração seria interessante a verificação da inativação térmica de *Salmonella* em cortes preparados nas mesmas condições, visto que a sobrevivência ou destruição de *Salmonella* nos cortes tem implicação direta sobre a ocorrência de ETA.

Neste estudo os ensaios foram realizados com peitos de frango que foram submetidos ao *tumbling* e tiveram adição de 1,5% de sal comercial, sendo de esta forma importante comparar a penetração de *S. Enteritidis* em peitos de frango in natura, a fim de verificar se estas condições foram importantes para o processo de penetração bacteriana ou se não interferiram neste processo.

Verificar a estrutura do tecido muscular nos dois tratamentos para determinar se a microbiota deteriorante, mesmo em baixas quantidades, é capaz de alterar a estrutura muscular, favorecendo a penetração bacteriana.

Devido à capacidade de penetração de *Salmonella* mesmo a baixas temperaturas é necessário que as ferramentas de prevenção sejam aprimoradas nas plantas de abate e processamento de aves para minimizar a contaminação de carcaças e cortes de frango.

Além disso, esses resultados reforçam a necessidade de intensificar o controle sobre os procedimentos para controle da contaminação em toda a cadeia produtiva do frango e especialmente no processamento do produto na planta industrial, a fim de reduzir os níveis de contaminação, visto que a ocorrência de salmonelose em humanos esta amplamente associada ao consumo de frango. Associado a isso existe a necessidade de esclarecimento da população sobre como manipular tais alimentos, especialmente com relação ao controle da temperatura de manutenção dos mesmos, visto que com esse trabalho evidenciamos o efeito da temperatura sobre o comportamento de penetração de *Salmonella*.

## REFERÊNCIAS

ALALI W. Q.; GAYDASHOW R.; PETROVA E.; PANIN A.; TUGARINOV O.; KULIKOVSKII A.; MAMLEEVA D.; WALLS I.; DOYLE M.P. Prevalence of *Salmonella* on retail chicken meat I Russian Federation. **Journal of Food Protection**, v.75, n.8, p.1469 – 1473, 2012.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ E.; ALONSO-CALLEJA C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ C.; CAPITA R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p.281-287, 2012.

ANTUNES P., RÉU C., SOUSA J. C., PEIXE L., PESTANA N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, 82, p.97-103, 2003.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. J. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializado em Pelotas, RS, Brasil, **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.303 – 307, 2001.

BONI, H. F. K.; CARRIJO A. S.; FASCINA V. B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouros de frangos de corte na região central do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira Saúde na Produção Animal**, Salvador, v.12, n.1, p. 84 -85, 2011.

BORCH E.; KANT-MUEMANSB M. L.; BLIXT Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 103-120, 1996.

BORGES K. A. **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de S. Enteritidis através da técnica de reação em cadeia de Polimerase**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BLASER, M. J.; NEWMAN, L. S. A review of human salmonellosis: I infective dose. **Journal of Infections disease**, v.4, p.1096 – 1106, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999-2009**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_ETA\\_brasil\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_ETA_brasil_2009.pdf), acesso em: 20/05/2009.

BRASIL, MAPA, **IN70, de 06/11/2003**. Programa de redução de patógenos monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp.. em carcaças de frango e perus, 2003.

BRASIL, MAPA, **Portaria 210, de 10/11/1998**. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienização Sanitária da carne de aves, 1998.

BRASIL. **Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)** 1994. Portaria número 8 de 23 de janeiro de 1995. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Método Análítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella* spp. Diário Oficial, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001.

CAPITA, R.; ASTORGA, A.; CALLEJA, C. A.; MORENO, B; FERNANDÉZ, M. C.G. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p. 169-173, 2003.

CARVALHO A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada (CMS), lingüiça e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, p. 1465 – 1468, 2005.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BURGER K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Presença de micro-organismos mesófilos, psicrótrópicos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n.3, p.303 – 307, 2005.

CHAGAS, S. S. **Tecnologia de produtos de origem animal**. UFSM, RS, 1994.

COGAN, T. A.; SLADER J.; BLOOMFIELD, S. F.; HUMPHREY J. J. “Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning products”. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.4, p. 885 – 892, 2002.

COSTA R. G.; FESTIVO M. L.; ARAUJO M. S.; REIS E. M. F.; LÁZARO N. S.; RODRIGUES D. P. Antimicrobial Susceptibility and Serovars of *Salmonella* Circulating in Commercial Poultry Carcasses and Poultry Products in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 12, p. 2011 – 2017, 2013.

COUSIN M. A., Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, n. 1, p.172 – 207, 1982.

D'AOUST J.-Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiol.**, v. 13, p. 207-216, 1991.

DOLATA, W.; PIOTROWSKA, E.; WAJDZIK, J.; TRITTGOC J. The use of the mRI technique in the evaluation of water distribution in tumbled porcine muscle. **Meat Science**, v. 65, p. 25-31, 2004.

DONADO-GODOY P. .; CLAVIJO V.; LÉON M.; TAFUR Mc A.; GONZALES S.; HUME M.; ALALI W.; WALLS J.; LO FO WONG D. M. A.; DOYLE M. P.; Prevalence of *Salmonella* on retail Broiler Chicken Meat Carcasses in Colombia. **Journal of Food Protection**, v 75, n.6, p.1134 – 1138, 2012.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT L. R.; MONTVILLE T. J. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. **American Society for Microbiology**, Washington, 768p., 2005.



DOWNES E. P.; ITO K. Compendium of Methods for the microbiological Examination of Foods. **American Public Helth Association**, Washington, 2001.

EC. ComissonRegulation. Ec no 1441/2007 de 5/12/2007 que altera o regulamento (CE) de 2073/ 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Oficial Journal of the European Union**, p. 12-29, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority). ECDC (European Centre for Disease prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **EFSA Journal**. V.11, n.4:3129, 250 p., 2013.

FLETCHER, D. L. Influence of sampling methodology on reported incidence of *Salmonella* in poultry. **Journal of AOAC International**, v. 89, p. 512-516, 2006.

FORSYTHE S. J. **Microbiologia da Segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed; 2002.

FRAZIER, W. C. e WESTHOFF, D. C., **Food Microbiology**, 4 edição, 1988.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES S. A.; FRANCO, B. D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v. 63, n.12, p.1749-1753, 2000.

GASPARETTO, K.M.P.O; COSER, S.H.F; GUIMARÃES, I.G.F.S; OLIVEIRA, T.C.R.M. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frango e avaliação da susceptibilidade a antimicrobiano. **Revista de Ciências Farmacêuticas**; v.22, n.2, p.185-199, 2001.

GHAFIR, Y.; CHINA B.; KORSACK N.; DIERICK K.; COLLARD J. M.; GODARD C.; LIEVEN De Z.; GEORGES D.; Belgian surveillance plant to assess changes in *Salmonella* prevalence in meat at different production stages. **Journal of Food Protection**. v. 68, p. 2269 – 2277, 2010.

GILL C. O. Intrinsic Bacteria in Meat. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 47, p.367-318, 1979.

GILL C. O.; LEET N. G.; PENNEY, N. Structural Changes Developing with Rigor that Facilitate Bacterial Invasion of Muscle Tissue. **Meat Science** v.10, p.265-274, 1984.

GILL C. O.; PENNEY N. Penetration of bacteria into meat. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.33, n.3, p. 1284 – 1286, 1977.

GILL C. O.; NEWTON K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**. v.2, n. 1, 1978.

GUIBORDENCHE M.; ROGGENTIN P.; MIKOLEIT M.; FIELDS P. I.; BOCKEMÜHL J.; GRIMONT P. A. D.; WEILL FX. Supplement 2003 – 2007(N° 47) to the White – Kauffman – Le Minor Scheme. **Research in Microbiology**, n. 161, p. 26-29, 2010.

HANSEM, T. B.; CRISTENSEN B. B.; AABO S. *Salmonella* in pork cutting in supermarkets and butcher shops in Denmark in 2002 and 2006. **Zoonoses Public Health**: v.57, n.3, 2010.

HEFFRON J. J. A.; HERGARTY P. V. J. Evidence for a relationship between atp hydrolysis and changes in extracellular space and fibre diameter during rigor development in skeletal muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.49, n.1, p. 43-50, 1974.

HOFFMAN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VENTURIM, T. M. Estudo Higiênico sanitário de frangos comercializados na cidade de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v.9, n.35, p. 31 -33, 1995.

HUE O.; BOUQUIN S. .; LALANDE F.; ALLAIN V.; ROUXEL S.; PETETIN I.; QUESNE S.; LAISNEY M. J.; GLOAGUN P. Y.; PICHROT M.; SALVAT G.; BOUGEARD S.; CHEMALY M. PREVALENCE OS *Salmonella* spp. On broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008. **Food Control**, v.22, p. 1158-1164, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Estatística da Produção Pecuária**, junho de 2012 Disponível em: [http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201201\\_publ\\_completa.pdf](http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201201_publ_completa.pdf). Acesso em: 20/12/2012.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6 ed. Maryland: Aspen Publishers Inc, 525 p., 2000.

JAY, J. M.; **Microbiologia de alimentos**/ trad. Eduardo Cesar Tondoet al., sexta edição- Porto Alegre: Artimed, 2005.

JONG, A. E. I.; ASSELT E. D.; ZWITERING M. H.; NAUTA M. J.; JONGE R. Extreme heat resistance of food borne pathogens *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* on chicken breast Fillet during cooking. **International Journal of Microbiology**, v. 2012 , n.1, p.1-10, 2012.

JORDAN E.; EGAN J.; DULLEA C.; WARD J.; McGILLICUDDY K.; MURRAY G.; MURPHY A.; BRADSHAW B.; LEONARD N.; RAFTER P.; McDOWELL S. *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004. **International Journal of Food Microbiology** , v. 112, p. 66–70, 2006.

KELL, M.; PICOLLI S U. Avaliação da presença de *Salmonella* em carcaças cortes comerciais e vísceras de frango refrigeradas em abatedouro do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 176 – 177, p. 151 – 153, 2008.

KOTTWITZ L. B. M.; OLIVEIRA T. C. A. M.; ALCOCER I.; FARAH S. M. S. S.; ABRAHÃO W. S. M.; RODRIGUES D. P. **Acta Scientiarum**, v.32, n.1, p. 9 – 15, 2010.

LILLARD, H. S. The impact of commercial processing producers on the bacterial contamination and cross – contamination of broiler carcasses. **Journal Food Protection**, v. 53, n. 3, p. 202 – 204, 1990.

LOPES M.; GALHARDO J. A.; OLIVEIRA J. T.; TAMANINI, R.; SANCHES S. F.; MULLER F. E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouros de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n.3, p. 465 -476, 2007.

LUBER P.; BARTELT E. Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 313–318, 2007.

LUBER P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs -which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology** v. 134, p. 21–28, 2009.

MAJOWICZ S. E.; MUSTO J.; SCALLANG.; ANGULO F. J.; KIRK M.; O BRIEN S. J.; JONES T. F.; FAZILA J.; HOEKSRA R. M. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, n.6, v.50, p.882 – 889, 2010.

MANTILLA S. P. S.; SANTOS E. B.; CONTE JUNIOR C. A.; MANO S. B.; VITAL H. C.; FRANCO R. M.; Bactérias deteriorantes em files de frango embalados e mar, vácuo e irradiados: Parâmetros bacteriológicos de desenvolvimento e prazo comercial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, n.4, p.271 – 277, 2009.

MATARAGAS M.; DROSINOS E. H.; VAIDANIS A.; METAXOPOULOS I. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, 2006.

MEAD G.; LAMMERDING A. M.; COX N.; DOYLE M. P.; HUMBERT F.; KULIKOVSKIY A.; PANIN A.; NASCIMENTO V. P.; WIERUP M.; Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. **Journal of Food Protection**, v.73, n.8, p.1566 – 1590, 2010.

MEDEIROS A. N.; OLIVEIRA D. C. N.; RODRIGUES D. P.; FREITAS D. R. C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Rev. Panam Salud Publica**, v.30, n.6, p. 555- 560, 2011.

MELLOR G. E.; BENTLEY J. A.; DYKES G. A. Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. **Food Microbiology**, v.28, p. 1101 – 1104, 2011.

MOZA, L. F.; GRIFFITHS, M. W.; BARBUT, L. Use of bioluminescent *Salmonella* enteric serovar Enteritidis to determine penetration in tumbled and hand tumbled marinated chicken breast fillets. **Journal Poultry Science**, v. 18, p. 269 – 271, 2009.

NZFSA, New Zealand Food Authority. **Food Safety Risk Profile for *Salmonella* Species in Broiler (young) chicken**, p.30, 2007.

PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R. M.; AYERS, T.; TAUXE, R. V.; BRADEN, C. R.; ANGUO, F. J.; GRIFFIN, P. M. Attribution of foodborne illness, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998 – 2008. **Emerging Infectious Diseases**. V19, n.3, p. 407 -415, 2013.

PENTEADO, F. R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – PR. **Biol. Health Science**, Ponta Grossa, v. 17, n.1, p. 37-45, 2011.

POPPE C. *Salmonella* Enteritidis in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p. 1-5, 1994.

QUADRO, D. P. F. **Avaliação da bacteriocina P 34 no crescimento de *Listeriamonocytogenes* em lingüiçafrescal de frango**. Dissertação. Porto Alegre, RS.

RACCACH, M.; BAKER, R. C. Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. **Poultry Science**, v.41, n.9, p. 703 – 705, 1978.

REITER M. G. R.; FIORESE M. L.; MORETTO G.; LÓPEZ M. C.; JORDANO R.; Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, p.1723, 2007.

REZENDE, C.S.M; MESQUITA, A.J; ANDRADE, M.A; LINHARES, G.F.C.; MESQUITA, A.Q; MINAFRA. C.S. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v.100, n.555-556, p.199-203,2005.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS L. R. *Salmonella* spp. in broilerparts: occurrence, antimicrobialresistance profile andphagetypingofthe*Salmonella* Enteritidis isolated. **Brazilian International Microbiological**, v. 38, p. 296 – 299, 2007.

RUBAN S. W.; THIYAGEESWARANM M.; SHARADHA R. Isolation and Identification of *Salmonella* spp. From retail chicken meat by polymerase chain reaction. **International Journal of Microbiology Research**, v.1, n.3, p.106 – 109, 2010.

SAKARIDIS I.; SOULTOS N.; ISSOFIDOU E.; KOIDIS P.; AMBROSIADIS I. Prevelene and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars from chicken carcasses in northen Greece. **Journal of Food Safety**, v. 31,n.1,p.203-210, 2011.

SANTOS, D.M.S.; A. J. FERNANDES, S.A.; et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.20, p. 39-42, 2000.

SCALLAN E.; HOEKATA R. M.; ANGULO F. J.; TAUXE R. V.; WIDDWSON M.A.; ROY S. L.; JONES . L.; GRIFFIN P. M. Foodborne illness Acquired in the United States- Major Pathogens.**Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, p.7-15, 2011.

SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC. **EFSC Journal**, v.10, n.3, p. 22-110, 2012.

SILVA E. N.; DUARTE A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.2, p.85-100, 2002.

SILVA N.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA N. F. A. ; TANIWAKI M. H.; SANTOS R. F. S.; GOMES R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Livraria Varela, São Paulo 4 edição, 2010.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, P. D. L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicrótroficas presentes no leite cru refrigerado**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SOARES, V.M. , PEREIRA, J.G., VIANA, V., BRAGA, T.I., BERSOT, L.S., PINTO, J.P.A.N. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food Microbiology**, v.30, n.2, p.453-456, 2012.

THOMAS C. J.; McMEEKIN T. A. Attachment of *Salmonella* spp. to Chicken Muscle Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 42, N. 1, P. 130-134, 1981.

THOMAS P. O. Development and Validation of a Predictive Microbiology Model for Survival and Growth of *Salmonella* on Chicken Stored at 4 to 12°C. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 2, p. 279–284, 2011.

THOMAS C. J.; D'ROUKE R. D.O; McMEEKIN T. A.; Bacterial penetration of chicken breast muscle. **Food Microbiology**, v.4, p.87-95, 1987.

TRABULSI L. R.; ALTERTHUM F.; GOMPERTZ O. F.; CANDEIAS J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: EditoraAtheneu, 3 edição, 1999.

VELASQUEZ A.; BRESLIN T. .; MARKS B. P.; ORTA-RAMIREZ A.; HALL N. O.; BORREN A. M.; RYSER E. T.. Enhanced thermal resistance of *Salmonella* in marinated whole muscle compared with ground pork. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 372 – 375, 2010.

VIEIRA, C. R. N.; TEIXEIRA, C. G. Condições higiênico sanitárias de carcaças resfriadas de frango comercializadas em Poços de Caldas – MG. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 48, p. 36 – 40, 1997.

YANG B.; XI M.; WANG X.; CUI S.; YUE T.; HAO H.; WANG Y.; CUI Y.; ALALI W. Q.; MENG J.; WALLS I.; LO FO WONG D. M.; DOYLE M. P. **Journal of Food protection**, v.74, n.10, p. 1724 – 1728, 2011.

ZDRAGAS A.; MAZARAKI K.; VAFEAS G.; GIANTZI V. PAPADOPOULOS T.; EKATERINIADOU L. **Letters in Applied Microbiology**, v.55, p. 308 – 313, 2012.

WARLOW C. R.; ARTA-RAMIREZ A.; MARKS B. P.; RYSER E. T.; BOOREN A. M. Single Directional Migration of *Salmonella* into Marinated Whole Muscle Turkey Breast. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p. 153–156, 2008.

**USA – USDA**. 2003. Code of Federal Regulations, Title 9 ( Animals and Animals Products) Chapter III ( Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture) , Part 381 ( Poultry Products Inspection Regulations) Acesso em : 18/02/2014, Disponível em:  
[http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_03/9cfr381\\_03.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/9cfr381_03.html)

Relatório Anual união Brasileira de Avicultura **UBABEF** – 2012  
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/41c30a0f46702351b561675f70fae077.pdf>  
 f acesso em 18/02/14.

## APÊNDICES

Apêndice A.	Resultados das contagens microbiológicas ( <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Pseudomonas</i> spp., BAL, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos) na avaliação da penetração de <i>S. Enteritidis</i> em Peito de Frango sob diferentes condições de temperatura (2, 7 e 12°C) tempos de estocagem (24, 48 e 72h) e segmentos (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	71
Apêndice B.	Médias das contagens de Bactérias lácticas em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	85
Apêndice C.	Médias das contagens de Psicrotróficos em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	85
Apêndice D.	Médias das contagens de Psicrotróficos proteolíticos em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C) tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II. ....	86

Apêndice A. Resultados das contagens microbiológicas (*Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas* spp., BAL, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos) na avaliação da penetração de *S. Enteritidis* em Peito de Frango sob diferentes condições de temperatura (2, 7 e 12°C) tempos de estocagem (24, 48 e 72h) e segmentos (base, meio e topo) nos tratamentos I e II.

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
1	T1	2	24	Base	+	400	0	600	100	10
1	T1	2	24	Meio	+	0	0	300	0	0
1	T1	2	24	Topo	+	0	0	100	100	0
1	T1	2	48	Base	+	400	0	3000	2000	120
1	T1	2	48	Meio	+	0	0	1600	1000	50
1	T1	2	48	Topo	+	0	0	3000	1500	80
1	T1	2	72	Base	+	400	0	42000	2700	310
1	T1	2	72	Meio	+	100	0	2200	2000	280
1	T1	2	72	Topo	+	0	0	8000	8000	100
1	T1	7	24	Base	+	100	0	1100	1100	10
1	T1	7	24	Meio	+	200	0	1500	1200	180
1	T1	7	24	Topo	+	0	0	3200	3100	120
1	T1	7	48	Base	+	100	0	3100	3100	80
1	T1	7	48	Meio	+	0	0	2000	1900	150
1	T1	7	48	Topo	+	0	0	3400	3400	100
1	T1	7	72	Base	+	300	0	4000	0	190
1	T1	7	72	Meio	+	0	100	5400	3800	380
1	T1	7	72	Topo	+	0	100	12000	10000	170
1	T1	12	24	Base	+	100	100	4400	4400	180
1	T1	12	24	Meio	+	0	0	3000	2700	140
1	T1	12	24	Topo	+	0	0	1400	1400	80
1	T1	12	48	Base	+	500	100	21500	18000	280
1	T1	12	48	Meio	+	300	100	3800	3700	220
1	T1	12	48	Topo	+	0	0	30100	30100	170
1	T1	12	72	Base	+	1500	100	40800	40800	810



Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
1	T1	12	72	Meio	+	400	100	41800	27000	840
1	T1	12	72	Topo	+	100	0	50300	50300	500
1	T2	2	24	Base	+	100	100	1000	300	50
1	T2	2	24	Meio	+	0	0	1100	1000	0
1	T2	2	24	Topo	+	0	0	1000	800	20
1	T2	2	48	Base	+	100	100	3000	2000	100
1	T2	2	48	Meio	+	0	0	3100	2000	120
1	T2	2	48	Topo	+	0	100	3000	3000	10
1	T2	2	72	Base	+	100	300	2400	1800	220
1	T2	2	72	Meio	+	0	200	7000	1000	240
1	T2	2	72	Topo	+	0	100	5000	5000	190
1	T2	7	24	Base	+	100	100	100	100	30
1	T2	7	24	Meio	+	0	100	100	0	90
1	T2	7	24	Topo	+	0	0	800	700	20
1	T2	7	48	Base	+	100	200	3100	3100	210
1	T2	7	48	Meio	+	100	100	3900	3000	230
1	T2	7	48	Topo	+	0	100	15000	13000	290
1	T2	7	72	Base	+	200	200	29600	29000	580
1	T2	7	72	Meio	+	100	200	30100	23000	420
1	T2	7	72	Topo	+	0	100	12200	12200	610
1	T2	12	24	Base	+	200	100	4400	4400	80
1	T2	12	24	Meio	+	0	200	4500	4500	140
1	T2	12	24	Topo	+	0	200	900	900	30
1	T2	12	48	Base	+	1000	200	50300	49000	190
1	T2	12	48	Meio	+	100	800	30100	22000	200
1	T2	12	48	Topo	+	0	1000	38100	38100	180
1	T2	12	72	Base	+	1200	300	40100	17000	700
1	T2	12	72	Meio	+	200	1100	50200	50200	420

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
1	T2	12	72	Topo	+	100	2100	49800	49800	470
1	C	2	24	Bloco	0	0	0	300	400	0
1	C	2	48	Bloco	0	0	0	1800	900	900
1	C	2	72	Bloco	0	0	0	1900	1000	100
1	C	7	24	Bloco	0	0	0	1800	1300	400
1	C	7	48	Bloco	0	0	0	14000	2800	200
1	C	7	72	Bloco	0	0	0	20000	3500	900
1	C	12	24	Bloco	0	0	0	21000	10000	10000
1	C	12	48	Bloco	0	0	0	43000	10000	3200
1	C	12	72	Bloco	0	0	0	41000	24000	24000
2	T1	2	24	Base	+	100	0	100	100	20
2	T1	2	24	Meio	+	0	0	200	100	0
2	T1	2	24	Topo	+	0	0	100	100	0
2	T1	2	48	Base	+	100	0	800	700	80
2	T1	2	48	Meio	+	100	0	900	700	50
2	T1	2	48	Topo	+	0	0	1800	200	0
2	T1	2	72	Base	+	200	0	800	200	120
2	T1	2	72	Meio	+	100	0	1200	100	120
2	T1	2	72	Topo	+	0	0	1800	100	130
2	T1	7	24	Base	+	100	0	300	2000	100
2	T1	7	24	Meio	+	0	0	400	400	80
2	T1	7	24	Topo	+	0	0	700	7000	80
2	T1	7	48	Base	+	100	0	300	3000	120
2	T1	7	48	Meio	+	100	0	1000	500	90
2	T1	7	48	Topo	+	0	0	7900	7000	150
2	T1	7	72	Base	+	100	0	3900	3700	180
2	T1	7	72	Meio	+	100	0	4800	4000	180
2	T1	7	72	Topo	+	0	0	13000	13000	230

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
2	T1	12	24	Base	+	100	0	8000	8000	130
2	T1	12	24	Meio	+	400	0	1000	1000	210
2	T1	12	24	Topo	+	100	0	7000	7000	120
2	T1	12	48	Base	+	2100	0	10100	10100	210
2	T1	12	48	Meio	+	500	0	8500	8500	320
2	T1	12	48	Topo	+	600	0	7800	7800	310
2	T1	12	72	Base	+	2300	100	8900	8900	330
2	T1	12	72	Meio	+	1400	100	11300	11300	410
2	T1	12	72	Topo	+	1200	0	18000	18000	300
2	T2	2	24	Base	+	300	100	0	0	70
2	T2	2	24	Meio	+	0	0	0	0	20
2	T2	2	24	Topo	+	0	0	200	120	0
2	T2	2	48	Base	+	300	100	0	0	70
2	T2	2	48	Meio	+	0	0	0	0	20
2	T2	2	48	Topo	+	0	0	100	100	50
2	T2	2	72	Base	+	1200	100	0	0	180
2	T2	2	72	Meio	+	100	0	0	0	210
2	T2	2	72	Topo	+	0	0	100	100	100
2	T2	7	24	Base	+	1200	100	2400	2400	120
2	T2	7	24	Meio	+	100	100	3100	3000	50
2	T2	7	24	Topo	+	0	0	2100	2100	20
2	T2	7	48	Base	+	1000	200	2400	1800	190
2	T2	7	48	Meio	+	100	100	3000	3000	50
2	T2	7	48	Topo	+	0	0	1800	10100	20
2	T2	7	72	Base	+	1300	200	8500	7000	230
2	T2	7	72	Meio	+	100	100	4200	2200	220
2	T2	7	72	Topo	+	0	0	2500	8900	190
2	T2	12	24	Base	+	200	100	2900	2900	210

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
2	T2	12	24	Meio	+	0	0	900	500	140
2	T2	12	24	Topo	+	0	0	7900	7900	180
2	T2	12	48	Base	+	560	700	16900	10000	310
2	T2	12	48	Meio	+	600	200	10800	10800	220
2	T2	12	48	Topo	+	1200	100	15000	15000	190
2	T2	12	72	Base	+	1100	1200	10100	8000	330
2	T2	12	72	Meio	+	1700	300	11900	11900	290
2	T2	12	72	Topo	+	1300	100	20100	20100	300
2	C	2	24	Bloco	0	0	0	900	300	100
2	C	2	48	Bloco	0	0	0	1200	300	0
2	C	2	72	Bloco	0	0	0	1600	500	0
2	C	7	24	Bloco	0	0	0	1900	1000	1000
2	C	7	48	Bloco	0	0	0	1900	1400	1400
2	C	7	72	Bloco	0	0	0	2300	1400	100
2	C	12	24	Bloco	0	0	0	13000	3700	3700
2	C	12	48	Bloco	0	0	0	17000	5600	5600
2	C	12	72	Bloco	0	0	0	20000	8400	8400
3	T1	2	24	Base	+	100	0	0	0	50
3	T1	2	24	Meio	+	0	0	0	0	0
3	T1	2	24	Topo	+	0	0	0	0	10
3	T1	2	48	Base	+	100	0	0	0	80
3	T1	2	48	Meio	+	0	0	0	0	100
3	T1	2	48	Topo	+	0	0	0	0	50
3	T1	2	72	Base	+	200	0	100	100	270
3	T1	2	72	Meio	+	100	0	100	100	380
3	T1	2	72	Topo	+	0	0	100	100	250
3	T1	7	24	Base	+	100	0	0	0	100
3	T1	7	24	Meio	+	0	0	100	100	20

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
3	T1	7	24	Topo	+	0	0	100	0	0
3	T1	7	48	Base	+	200	0	0	0	190
3	T1	7	48	Meio	+	100	0	500	300	210
3	T1	7	48	Topo	+	0	0	100	0	100
3	T1	7	72	Base	+	400	0	100	100	320
3	T1	7	72	Meio	+	200	0	500	200	480
3	T1	7	72	Topo	+	0	0	300	100	700
3	T1	12	24	Base	+	500	0	300	300	50
3	T1	12	24	Meio	+	0	0	300	200	10
3	T1	12	24	Topo	+	0	0	0	0	80
3	T1	12	48	Base	+	1500	0	1000	1000	250
3	T1	12	48	Meio	+	100	0	1800	1800	390
3	T1	12	48	Topo	+	100	0	3000	1600	410
3	T1	12	72	Base	+	4200	0	3500	3500	1020
3	T1	12	72	Meio	+	1800	0	4500	4500	700
3	T1	12	72	Topo	+	200	0	3300	1800	830
3	T2	2	24	Base	+	100	100	100	0	30
3	T2	2	24	Meio	+	0	0	100	0	10
3	T2	2	24	Topo	+	0	0	0	0	10
3	T2	2	48	Base	+	300	100	200	100	120
3	T2	2	48	Meio	+	0	0	100	0	80
3	T2	2	48	Topo	+	0	0	0	0	50
3	T2	2	72	Base	+	300	200	200	200	310
3	T2	2	72	Meio	+	100	0	400	200	220
3	T2	2	72	Topo	+	0	0	100	100	190
3	T2	7	24	Base	+	700	100	200	100	150
3	T2	7	24	Meio	+	0	0	300	300	100
3	T2	7	24	Topo	+	0	0	100	0	20

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
3	T2	7	48	Base	+	800	200	500	0	270
3	T2	7	48	Meio	+	0	100	300	300	130
3	T2	7	48	Topo	+	0	0	300	0	140
3	T2	7	72	Base	+	1000	1200	1200	1200	520
3	T2	7	72	Meio	+	200	300	400	400	470
3	T2	7	72	Topo	+	0	0	400	200	380
3	T2	12	24	Base	+	1800	100	100	100	210
3	T2	12	24	Meio	+	0	0	200	0	120
3	T2	12	24	Topo	+	0	0	500	100	10
3	T2	12	48	Base	+	1800	1800	800	200	380
3	T2	12	48	Meio	+	100	200	1200	300	180
3	T2	12	48	Topo	+	100	0	1100	400	120
3	T2	12	72	Base	+	3300	2900	4200	2500	490
3	T2	12	72	Meio	+	200	700	2400	2000	470
3	T2	12	72	Topo	+	100	100	3900	1900	370
3	C	2	24	Bloco	0	0	0	400	300	100
3	C	2	48	Bloco	0	0	0	1400	500	100
3	C	2	72	Bloco	0	0	0	1400	900	0
3	C	7	24	Bloco	0	0	0	2400	900	300
3	C	7	48	Bloco	0	0	0	3900	1400	800
3	C	7	72	Bloco	0	0	0	12000	1900	200
3	C	12	24	Bloco	0	0	0	23000	2500	600
3	C	12	48	Bloco	0	0	0	23000	3800	3800
3	C	12	72	Bloco	0	0	0	41000	4500	100
4	T1	2	24	Base	+	100	0	100	100	540
4	T1	2	24	Meio	+	0	0	0	0	0
4	T1	2	24	Topo	+	0	0	0	0	70
4	T1	2	48	Base	+	100	0	200	0	500

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
4	T1	2	48	Meio	+	0	0	0	0	30
4	T1	2	48	Topo	+	0	0	0	0	70
4	T1	2	72	Base	+	100	0	1200	800	500
4	T1	2	72	Meio	+	0	0	100	100	210
4	T1	2	72	Topo	+	0	0	100	100	190
4	T1	7	24	Base	+	100	0	1800	100	500
4	T1	7	24	Meio	+	0	0	300	1000	10
4	T1	7	24	Topo	+	0	0	1700	300	40
4	T1	7	48	Base	+	200	0	1800	1200	500
4	T1	7	48	Meio	+	0	0	2700	1100	190
4	T1	7	48	Topo	+	0	0	2300	2000	220
4	T1	7	72	Base	+	300	0	3200	3200	610
4	T1	7	72	Meio	+	0	0	2900	2100	500
4	T1	7	72	Topo	+	0	0	2500	1200	380
4	T1	12	24	Base	+	100	0	2800	2200	410
4	T1	12	24	Meio	+	0	0	3500	0	120
4	T1	12	24	Topo	+	0	0	1800	1300	0
4	T1	12	48	Base	+	300	0	4100	4100	710
4	T1	12	48	Meio	+	200	0	3200	2700	380
4	T1	12	48	Topo	+	0	0	3800	2400	180
4	T1	12	72	Base	+	1100	0	12100	15000	830
4	T1	12	72	Meio	+	600	0	9900	9900	580
4	T1	12	72	Topo	+	100	0	18700	15000	620
4	T2	2	24	Base	+	0	200	300	200	90
4	T2	2	24	Meio	+	0	0	500	500	110
4	T2	2	24	Topo	+	0	0	800	0	0
4	T2	2	48	Base	+	100	200	300	200	170
4	T2	2	48	Meio	+	0	0	100	100	130

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
4	T2	2	48	Topo	+	0	0	900	100	20
4	T2	2	72	Base	+	150	200	1800	1200	310
4	T2	2	72	Meio	+	0	0	100	0	180
4	T2	2	72	Topo	+	0	0	1000	200	210
4	T2	7	24	Base	+	200	1000	2100	1800	510
4	T2	7	24	Meio	+	0	0	1000	1000	10
4	T2	7	24	Topo	+	0	0	700	500	110
4	T2	7	48	Base	+	100	2300	2300	600	570
4	T2	7	48	Meio	+	0	0	2100	900	190
4	T2	7	48	Topo	+	0	0	1300	1200	180
4	T2	7	72	Base	+	100	2300	2700	1500	800
4	T2	7	72	Meio	+	100	100	3000	1800	380
4	T2	7	72	Topo	+	0	0	3200	3200	410
4	T2	12	24	Base	+	100	100	3800	3800	410
4	T2	12	24	Meio	+	100	200	3200	3200	140
4	T2	12	24	Topo	+	0	0	4800	3700	120
4	T2	12	48	Base	+	1800	1300	5100	4800	690
4	T2	12	48	Meio	+	400	700	4200	4000	180
4	T2	12	48	Topo	+	100	0	5300	3000	120
4	T2	12	72	Base	+	2500	2100	13200	13200	710
4	T2	12	72	Meio	+	400	1500	7200	7200	380
4	T2	12	72	Topo	+	200	500	11100	68000	450
4	C	2	24	Bloco	0	0	0	200	300	0
4	C	2	48	Bloco	0	0	0	900	400	200
4	C	2	72	Bloco	0	0	0	1700	1000	500
4	C	7	24	Bloco	0	0	0	1800	1300	1300
4	C	7	48	Bloco	0	0	0	3200	1800	1000
4	C	7	72	Bloco	0	0	0	4100	2400	2300



Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
4	C	12	24	Bloco	0	0	0	13000	12000	12000
4	C	12	48	Bloco	0	0	0	14000	10000	10000
4	C	12	72	Bloco	0	0	0	28000	18000	12000
5	T1	2	24	Base	+	100	0	100	100	10
5	T1	2	24	Meio	+	0	0	100	100	10
5	T1	2	24	Topo	+	0	0	0	0	10
5	T1	2	48	Base	+	100	0	600	500	30
5	T1	2	48	Meio	+	0	0	500	300	60
5	T1	2	48	Topo	+	0	0	300	0	90
5	T1	2	72	Base	+	100	0	1000	700	100
5	T1	2	72	Meio	+	0	0	1000	1000	200
5	T1	2	72	Topo	+	0	0	1500	1200	300
5	T1	7	24	Base	+	300	0	300	300	100
5	T1	7	24	Meio	+	100	0	300	100	20
5	T1	7	24	Topo	+	0	0	600	400	40
5	T1	7	48	Base	+	400	0	400	200	130
5	T1	7	48	Meio	+	100	0	1000	1000	70
5	T1	7	48	Topo	+	0	0	2000	2000	100
5	T1	7	72	Base	+	400	100	2000	1700	190
5	T1	7	72	Meio	+	100	0	3500	3200	150
5	T1	7	72	Topo	+	0	0	3500	1800	200
5	T1	12	24	Base	+	700	0	3400	300	200
5	T1	12	24	Meio	+	0	0	2400	200	140
5	T1	12	24	Topo	+	0	0	1700	1200	100
5	T1	12	48	Base	+	1100	0	9000	7700	300
5	T1	12	48	Meio	+	100	0	10000	800	180
5	T1	12	48	Topo	+	0	0	8500	300	400
5	T1	12	72	Base	+	1800	200	13400	11200	500

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
5	T1	12	72	Meio	+	1800	100	15000	15000	400
5	T1	12	72	Topo	+	200	0	14000	10000	600
5	T2	2	24	Base	+	100	100	100	0	40
5	T2	2	24	Meio	+	0	0	100	100	30
5	T2	2	24	Topo	+	0	0	100	0	0
5	T2	2	48	Base	+	100	100	500	300	50
5	T2	2	48	Meio	+	0	0	800	800	30
5	T2	2	48	Topo	+	0	0	100	100	0
5	T2	2	72	Base	+	200	100	1300	300	90
5	T2	2	72	Meio	+	0	0	800	500	60
5	T2	2	72	Topo	+	0	0	100	100	60
5	T2	7	24	Base	+	100	200	600	600	100
5	T2	7	24	Meio	+	100	100	1000	500	10
5	T2	7	24	Topo	+	0	0	700	700	20
5	T2	7	48	Base	+	200	200	3500	3000	240
5	T2	7	48	Meio	+	200	100	2800	2300	60
5	T2	7	48	Topo	+	0	0	2400	2200	50
5	T2	7	72	Base	+	300	300	6500	5700	320
5	T2	7	72	Meio	+	200	100	5000	4200	200
5	T2	7	72	Topo	+	0	0	3100	3000	110
5	T2	12	24	Base	+	500	200	1200	1200	100
5	T2	12	24	Meio	+	100	100	2000	1300	110
5	T2	12	24	Topo	+	0	0	4200	4200	120
5	T2	12	48	Base	+	1000	400	12000	8500	300
5	T2	12	48	Meio	+	200	300	13000	13000	240
5	T2	12	48	Topo	+	100	200	12300	12300	180
5	T2	12	72	Base	+	2800	700	23500	20500	420
5	T2	12	72	Meio	+	1000	300	31200	31200	310

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
5	T2	12	72	Topo	+	300	200	43000	43000	400
5	C	2	24	Bloco	0	0	0	1000	200	200
5	C	2	48	Bloco	0	0	0	1900	400	300
5	C	2	72	Bloco	0	0	0	2100	400	400
5	C	7	24	Bloco	0	0	0	3200	800	400
5	C	7	48	Bloco	0	0	0	3700	1200	800
5	C	7	72	Bloco	0	0	0	4100	1300	1300
5	C	12	24	Bloco	0	0	0	30000	13000	900
5	C	12	48	Bloco	0	0	0	33000	17000	210
5	C	12	72	Bloco	0	0	0	41000	23000	900
6	T1	2	24	Base	+	100	0	100	100	20
6	T1	2	24	Meio	+	0	0	100	100	50
6	T1	2	24	Topo	+	0	0	0	0	80
6	T1	2	48	Base	+	100	0	100	0	120
6	T1	2	48	Meio	+	0	0	100	0	180
6	T1	2	48	Topo	+	0	0	100	100	80
6	T1	2	72	Base	+	100	0	200	0	290
6	T1	2	72	Meio	+	0	0	100	0	310
6	T1	2	72	Topo	+	0	0	100	0	200
6	T1	7	24	Base	+	300	0	1300	1000	120
6	T1	7	24	Meio	+	100	0	1500	800	100
6	T1	7	24	Topo	+	0	0	800	100	80
6	T1	7	48	Base	+	100	0	1900	1700	210
6	T1	7	48	Meio	+	100	0	2500	200	120
6	T1	7	48	Topo	+	0	0	1100	1000	110
6	T1	7	72	Base	+	100	0	1900	1000	400
6	T1	7	72	Meio	+	100	0	2700	2200	410
6	T1	7	72	Topo	+	0	0	2700	2000	370

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
6	T1	12	24	Base	+	400	0	1800	1200	210
6	T1	12	24	Meio	+	0	0	3200	2500	180
6	T1	12	24	Topo	+	0	0	2100	2100	100
6	T1	12	48	Base	+	1000	0	3800	3800	410
6	T1	12	48	Meio	+	200	0	7200	6700	450
6	T1	12	48	Topo	+	0	0	9500	9000	380
6	T1	12	72	Base	+	1400	0	8700	8700	710
6	T1	12	72	Meio	+	800	0	10300	10300	610
6	T1	12	72	Topo	+	300	0	17700	5000	500
6	T2	2	24	Base	+	100	0	100	0	10
6	T2	2	24	Meio	+	100	0	0	0	10
6	T2	2	24	Topo	+	0	0	0	0	20
6	T2	2	48	Base	+	100	100	100	100	100
6	T2	2	48	Meio	+	100	0	100	0	80
6	T2	2	48	Topo	+	0	0	100	100	70
6	T2	2	72	Base	+	100	200	200	0	210
6	T2	2	72	Meio	+	100	0	100	0	190
6	T2	2	72	Topo	+	0	0	300	0	200
6	T2	7	24	Base	+	100	100	1000	1000	100
6	T2	7	24	Meio	+	100	0	700	700	70
6	T2	7	24	Topo	+	0	0	100	0	50
6	T2	7	48	Base	+	200	300	1200	1000	180
6	T2	7	48	Meio	+	100	0	1800	1200	120
6	T2	7	48	Topo	+	0	0	1900	200	120
6	T2	7	72	Base	+	300	800	1800	0	370
6	T2	7	72	Meio	+	200	100	1900	1700	350
6	T2	7	72	Topo	+	0	0	2200	1100	300
6	T2	12	24	Base	+	600	100	1000	1000	280

Repetição	Tratamento	Temper.	Tempo	Segm.	<i>Salmonella</i> Qual.	<i>Salmonella</i> Quant.	<i>Pseudomonas</i>	Psicrotrófico	Psicro proteolíticos	BAL
6	T2	12	24	Meio	+	100	100	800	700	100
6	T2	12	24	Topo	+	0	0	500	300	70
6	T2	12	48	Base	+	900	1200	4500	4500	510
6	T2	12	48	Meio	+	200	100	7500	7500	120
6	T2	12	48	Topo	+	100	0	2900	1400	120
6	T2	12	72	Base	+	2900	2100	21200	7000	680
6	T2	12	72	Meio	+	1000	300	20100	20100	600
6	T2	12	72	Topo	+	400	100	18900	18900	450
6	C	2	24	Bloco	0	0	0	600	100	100
6	C	2	48	Bloco	0	0	0	1600	100	0
6	C	2	72	Bloco	0	0	0	2100	200	0
6	C	7	24	Bloco	0	0	0	3100	200	200
6	C	7	48	Bloco	0	0	0	12000	800	500
6	C	7	72	Bloco	0	0	0	18000	1000	300
6	C	12	24	Bloco	0	0	0	23000	12000	400
6	C	12	48	Bloco	0	0	0	38000	21000	1200
6	C	12	72	Bloco	0	0	0	51000	23000	20000

Apêndice B. Médias das contagens de Bactérias lácticas em Log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II.

Temp.	Estoc.	Trat.	Segmento da sub-amostra		
			Base	Meio	Topo
2°C	24	I	2,30	1,00	1,00
		II	2,72	1,00	1,00
	48	I	2,25	2,90	2,60
		II	2,04	1,90	1,60
	72	I	2,90	1,00	2,20
		II	2,40	2,10	1,70
7°C	24	I	2,20	1,80	1,80
		II	2,25	2,69	1,30
	48	I	2,34	2,17	2,11
		II	2,38	2,38	2,17
	72	I	2,23	2,59	2,50
		II	2,69	2,59	2,56
12°C	24	I	2,27	2,11	1,88
		II	2,36	2,25	1,91
	48	I	2,56	2,54	2,46
		II	2,61	2,25	2,14
	72	I	2,86	2,79	2,74
		II	2,64	2,63	2,60

Apêndice C. Médias das contagens de Psicotróficos em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C), tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II.

Temp.	Estoc.	Trat.	Segmento da sub-amostra		
			Base	Meio	Topo
2°C	24	I	2,00	1,00	1,00
		II	1,40	2,60	1,47
	48	I	2,85	1,84	2,00
		II	2,28	3,84	1,60
	72	I	3,85	3,14	2,27
		II	3,60	2,77	2,82
7°C	24	I	2,90	3,00	3,84
		II	3,00	3,95	3,84
	48	I	3,00	3,60	1,87
		II	3,30	3,51	4,29
	72	I	3,40	4,84	4,56
		II	3,86	3,34	4,60
12°C	24	I	3,53	3,47	4,59
		II	3,56	3,25	3,36
	48	I	3,45	4,04	3,52
		II	3,08	3,57	4,00
	72	I	3,49	5,43	4,14
		II	4,34	2,70	4,39

Apêndice D. Médias das contagens de Psicrotróficos proteolíticos em log/UFC por temperatura (2, 7 e 12°C) tempo de estocagem (24, 48 e 72h) e segmento (base, meio e topo) nos tratamentos I e II.

Temp.	Estoc.	Trat.	Segmento da sub-amostra		
			Base	Meio	Topo
2°C	24h	I	1,00	1,00	1,00
		II	1,00	2,00	1,00
	48h	I	1,00	4,00	1,00
		II	2,00	3,00	1,00
	72h	I	6,00	3,00	1,00
		II	3,00	2,00	4,00
7°C	24h	I	3,00	5,00	3,00
		II	1,00	1,00	5,00
	48h	I	1,00	4,00	2,70
		II	1,00	3,10	1,80
	72h	I	1,30	2,10	2,10
		II	1,50	4,10	2,70
12°C	24h	I	2,10	1,70	1,00
		II	1,60	1,00	1,90
	48h	I	1,50	1,00	2,00
		II	1,00	2,40	2,30
	72h	I	2,30	2,50	2,30
		II	1,10	2,00	1,80